

**JULIANO RIBEIRO**

**FILOGEOGRAFIA DE *Mimagoniates microlepis* (Teleostei, Characidae, Glandulocaudinae) DE RIACHOS DA PLANÍCIE COSTEIRA E DO PRIMEIRO PLANALTO PARANAENSE, BASEADA EM MARCADORES MOLECULARES RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).**

**CURITIBA**

**2006**

**JULIANO RIBEIRO**

**FILOGEOGRAFIA DE *Mimagoniates microlepis* (Teleostei, Characidae, Glandulocaudinae) DE RIACHOS DA PLANÍCIE COSTEIRA E DO PRIMEIRO PLANALTO PARANAENSE, BASEADA EM MARCADORES MOLECULARES RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo A. Torres.

**CURITIBA**

**2006**

**Dedico este trabalho aos  
Grandes amores de minha vida,  
minha esposa Michele, minha mãe  
Inês e aos meus familiares.**

**“Chegará o dia em que o homem conhecerá o íntimo dos animais. E neste dia qualquer crime cometido contra um animal será um crime cometido contra a humanidade”.**

**Leonardo da Vinci**

## **AGRADECIMENTOS**

A realização da presente dissertação só foi possível graças ao apoio de várias pessoas e de algumas instituições. Desta forma, reconhecendo a inestimável colaboração sou grato:

- A Deus, minha esposa Michele, minha mãe Inês e aos meus familiares.
- Ao Curso de Pós Graduação em Zoologia da UFPR, por acreditar e proporcionar o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao CNPq pela bolsa de estudo fornecida.
- Ao Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres, pela orientação, paciência e pela sua grande amizade.
- Ao Prof. Walter A. P. Boeger, PhD, do Departamento de Zoologia/UFPR, pelo apoio dado desde do início e empréstimo dos seus equipamentos de laboratório, sem os quais não teria sido possível o desenvolvimento do meu trabalho.
- A todos os colegas do Laboratório de Parasitologia Evolutiva (Departamento de Zoologia/UFPR), em especial a Luciana Patella, Raphael Ribeiro e José Francisco Oliveira Neto pela grande ajuda dada nestes dois anos.
- A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Maria Koelblinger Sodré, do Departamento de Biologia Geral/UEL, pela inestimável ajuda dada para o desenvolvimento desta dissertação, bem como, a todos os integrantes do seu laboratório, em especial à Fernanda Simões de Almeida e ao Juliano V. B. Ramos.
- Ao Prof. Dr. José M. R. Aranha pelo apoio logístico em algumas coletas, bem como a todos os integrantes do laboratório de Ecologia de Rios do Departamento de Zoologia da UFPR, em especial ao doutorando Jean R. S. Vitule.
- Ao Prof. Dr. Gabriel A. Mello, Departamento de Zoologia/UFPR, pelas orientações relativas aos métodos de análise filogenética (Parcimônia), bem como aquelas relativas à utilização do software Nona, por meio da sua interface Winclada.
- Ao Prof. James J. Roper, PhD, pelos esclarecimentos relativos às análises estatísticas..

- Ao amigo Rogério Tubino Vianna, MSc. não só pelo auxílio nas coletas e utilização dos programas, mas também pelas discussões e conversas informais que muito me ajudaram.
- Ao Márcio R. Pie, MSc. e ao Dr. Guilherme S. Schühli pelas excelentes discussões e explicações que muito contribuíram.
- A todos os meus colegas de curso, em especial a Gislaine Otto e a Márcia Cziulik pela grande amizade formada.
- Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Zoologia, Maurício Roberts, MSc. e Miodeli N. Júnior, MSc. pelas discussões realizadas.
- A todo pessoal do Museu de História Natural do Capão da Imbuia, em especial a Gislaine Otto, Dr. Vinícius Abilhoa, Dr. Luiz F. Duboc e Leonardo F. S. Ingênito, MSc., pelo auxílio nas coletas e identificação dos peixes.
- A todos os Professores do Curso pelos conhecimentos e ensinamentos transmitidos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Princípios da filogeografia.....	01
1.2 Características biológicas de <i>Mimagoniates microlepis</i> .....	02
1.3 Marcadores moleculares RAPD em peixes Neotropicais associados a questões geográficas.....	03
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	08
2.1 Material.....	08
2.2 Métodos.....	11
2.2.1 Extração do DNA.....	11
2.2.2 Marcadores RAPD.....	12
2.2.3 Protocolo do PCR.....	13
2.2.4 Análise dos dados.....	14
3 RESULTADOS.....	17
3.1 Perfis RAPD.....	17
3.2 Análise das relações genéticas e evolutivas.....	24
3.3 AMOVA e parâmetros populacionais .....	30
4 DISCUSSÃO.....	34
4.1 Dados de RAPD, diversidade genética e biológica em <i>M. microlepis</i> ....	34
4.2 Estruturação genético-evolutiva em <i>M. microlepis</i> .....	37
4.2.1 Alto Iguaçu.....	37
4.2.2 Planície Costeira.....	40
4.2.3. Serra do Mar e a filogeografia de <i>M. microlepis</i> .....	42
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
6 CONCLUSÕES.....	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS I.....	61
ANEXOS II.....	64

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Exemplar de *Mimagoniates microlepis* com cerca de 7cm de comprimento total, como forma de demonstração da espécie estudada .....08

**Figura 2.** Mapa da América do Sul (acima, à esquerda) indicando a região de estudo. Os numeros representam a posição relativa dos locais de amostragem de *Mimagoniates microlepis*: 1 rio Piraquara, 2 rio Caerana, 3 rio Pequeno, 4 rio da Várzea, 5 rio Água Verde, 6 rio Mergulhão, 7 rio Ribeirão, 8 rio Mongaguá, 9 rio Caixa d'Água e 10 afluente do rio Acarai. A linha pontilhada representa o perfil da cadeia montanhosa da Serra do Mar ao longo dos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina.....10

**Figura 3a.** Eletroforese em gel de agarose 1,4% (primer OPA2), como forma de representação dos perfis RAPD obtidos para as amostras pertencentes ao Primeiro Planalto Paranaense (ver Tabela 1 para detalhes). L= Ladder (marcador de peso molecular de 100pb), B= controle negativo. Os numerais de 1 a 10 representam os dez espécimes de *Mimagoniates microlepis* amostrados nos rios descritos acima.....20

**Figura 3b.** Eletroforese em gel de agarose 1,4% (primer OPA2), como forma de representação dos perfis RAPD obtidos para as amostras pertencentes a Planície Costeira (ver Tabela 1 para detalhes). L= Ladder (marcador de peso molecular de 100pb), B= controle negativo. Os numerais de 1 a 10 representam os dez espécimes de *Mimagoniates microlepis* amostrados nos rios descritos acima.....21

**Figura 4a.** Eletroforese em gel de agarose 1,4% (primer OPW5), como forma de representação dos perfis RAPD obtidos para as amostras pertencentes ao Primeiro Planalto Paranaense (ver Tabela 1 para detalhes). L= Ladder (marcador de peso molecular de 100pb), B= controle negativo. Os numerais de 1 a 10 representam os dez espécimes de *Mimagoniates microlepis* amostrados nos rios descritos acima.....22

**Figura 4b.** Eletroforese em gel de agarose 1,4% (primer OPW5), como forma de representação dos perfis RAPD obtidos para as amostras pertencentes a Planície Costeira (ver Tabela 1 para detalhes). L= Ladder (marcador de peso molecular de 100pb), B= controle negativo. Os numerais de 1 a 10 representam os dez espécimes de *Mimagoniates microlepis* amostrados nos rios descritos acima.....23

**Figura 5.** Relações filogenéticas entre as amostras de *Mimagoniates microlepis* obtida pela análise de Neighbor-Joining com *M. lateralis* como grupo externo. As diferentes cores indicam os dois grupos evolutivos identificados (Azul= Planície Costeira; Alaranjado= Alto Iguaçu). A linha pontilhada indica a Serra do Mar como o divisor dos grupamentos genéticos. Os valores de Bootstrap/Jackknife encontram-se indicados nos ramos.....25

**Figura 6.** Relações filogenéticas entre as amostras de *Mimagoniates microlepis* obtida pela análise de parcimônia com *M. lateralis* como grupo externo. As diferentes cores indicam os dois grupos evolutivos identificados (Azul= Planície Costeira; Alaranjado= Alto Iguaçu). A linha pontilhada indica a Serra do Mar como o divisor dos grupamentos



genéticos. Os valores de Bootstrap/Jackknife encontram-se indicados nos ramos.....26

**Figura 7.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as médias das distâncias genéticas e a distâncias geográficas relativas (km) entre todas as amostras de *M. microlepis* estudadas.....28

**Figura 8.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as médias das distâncias genéticas e a distâncias geográficas relativas (km) entre as amostras de *M. microlepis* estudadas da região do Alto Iguaçu.....28

**Figura 9.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as médias das distâncias genéticas e a distâncias geográficas relativas (km) entre as amostras de *M. microlepis* estudadas da região da Planície Costeira.....29

**Figura 10.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as médias das distâncias genéticas e a distâncias geográficas relativas (km) entre as amostras de *M. microlepis* estudadas do Alto Iguaçu em relação àquelas da Planície Costeira.....29

**Figura 11.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as distâncias geográficas relativas (km) e os valores de  $N_m$  pareados, mediante todas as amostras de *M. microlepis* estudadas.....33

**Figura 12.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as distâncias geográficas relativas (km) e os valores de  $G_{ST}$  pareados, mediante todas as amostras de *M. microlepis* estudadas.....33

**Figura 13.** Região costeira Sudeste/Sul do Brasil com as cadeias montanhosas constituintes da Serra do Mar na região estudada (a-c). 1-Alto Iguaçu, 2-Planície Costeira PR, 3-Planície Costeira do Norte SC e 4-Planície Costeira Sul de SP, as quais abrigam as 4 áreas biogeográficas propostas como hospedeiras das 8 unidades genético-evolutivas. As setas em branco identificam as barreiras de isolamento entre as unidades biogeográficas.....44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Rios e as respectivas localidades amostradas de <i>Mimagoniates microlepis</i> (para maiores detalhes consultar o mapa nas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6). As siglas da coluna “amostras” descrevem as localidades estudadas: PIR= rio Piraquara; CAE= rio Caerana; PEQ= rio Pequeno; VAR= rio da Várzea; AGU= rio Água Verde; MER= rio Mergulhão; RIB= rio Ribeirão; MON= rio Mongaguá; ITA= rio Caixa d’Água; ACA= rio Acaraí. PPP= Primeiro Planalto Paranaense; PSC= Planalto de Santa Catarina; PC= Planície Costeira.....	09
<b>Tabela 2.</b> Seqüências nucleotídicas dos primers utilizados no presente estudo.....	13
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros utilizados no termociclador para a realização do PCR.....	13
<b>Tabela 4.</b> Componentes da reação de amplificação do DNA e suas respectivas concentrações e volumes.....	14
<b>Tabela 5.</b> Diversidade genética observada dentro de cada amostra de <i>M. microlepis</i> , em relação ao conjunto total de locos analisados. Ntl=nº total de locos; Nlv= nº de locos variantes; Dg= diversidade genética.....	17
<b>Tabela 6.</b> Diversidade genética observada dentro de cada amostra de <i>M. microlepis</i> , em relação ao conjunto total de locos presentes em cada amostra. Ntl= nº total de locos presentes em cada amostra; Nlv= nº de locos variantes em cada amostra; Dg= diversidade genética.....	18
<b>Tabela 7.</b> Médias das distâncias genéticas (Nei, 1972) obtidas entre as amostras estudadas de <i>Mimagoniates microlepis</i> (acima da diagonal). Distância geográfica relativa (km) entre as amostras estudadas (abaixo da diagonal). PIR= rio Piraquara; CAE= rio Caerana; PEQ= rio Pequeno; VAR= rio da Várzea; AGU= rio Água Verde; MER= rio Mergulhão; RIB= rio Ribeirão; MON= rio Mongaguá; ITA= rio Caixa d’Água; ACA= rio Acaraí.....	19

**Tabela 8.** Resultados obtidos segundo a análise de AMOVA envolvendo todas as amostras estudadas de *M. microlepis*. Gl= graus de liberdade; Sq= soma dos quadrados; Qm= quadrado médio; F= teste exato de Fisher; CV= Componentes da variância; p= significância estatística.....31

**Tabela 9.** Valores de  $G_{ST}$  (acima do diagonal) e  $Nm$  (abaixo da diagonal) obtidos entre as amostras estudadas de *M. microlepis*. PIR= rio Piraquara; CAE= rio Caerana; PEQ= rio Pequeno; VAR= rio da Várzea; AGU= rio Água Verde; MER= rio Mergulhão; RIB= rio Ribeirão; MON= rio Mongaguá; ITA= rio Caixa d'Água; ACA= rio Acarai.....31

**Tabela 10.** Resultado das análises de Correlação de Spearman entre distância geográfica relativa (Km) e número de migrantes ( $Nm$ ) e, entre distância geográfica relativa (km) e diversidade genética interpopulacional ( $G_{ST}$ ), mediante as amostras de *M. microlepis* das regiões do Alto Iguaçu, as amostras da Planície Costeira e entre ambas as regiões. N= número de correlações; r= índice de correlação; p= significância.  
\* Intervalo de confiança de 95%.....32

## RESUMO

Inferências filogeográficas podem contribuir para estudos de ecologia e evolução através da identificação de regiões evolutivamente independentes, fornecer um contexto evolutivo e geográfico para espécies e suas populações, além de permitir a identificação e o relacionamento entre áreas. Neste contexto, a história evolutiva e ecológica de *Mimagoniates microlepis* do Primeiro Planalto Paranaense (Alto Iguaçu) e da Planície Costeira, foi reconstruída por meio dos marcadores moleculares RAPD. Dez amostras de dez diferentes riachos foram analisadas. A diversidade genética geral para a espécie foi estimada em 95,4%. A variedade genética em relação ao total de loci demonstrou que o rio Caerana foi o que mais contribui com o total da diversidade genética geral estimada (45,04%), enquanto que os rios Acaraí (21,62%), Água Verde (21,62%) e da Várzea (20,72%) foram os que menos contribuíram. Já, a diversidade genética própria de cada grupo amostral, apontou o Rio Mergulhão com a maior diversidade genética intrapopulacional (80,39%) e o Rio Acaraí com a menor (44,44%). As médias das distâncias genéticas, variaram desde 0,221 entre as amostras do Rio Mongaguá e do Rio Caixa d'Água até 0,461 entre as amostras do Rio Água Verde e do Rio Mongaguá. Foram ainda identificadas as distâncias geográficas relativas entre as amostras estudadas, onde as mesmas variaram desde 2,2 Km, entre as amostras dos Rios Piraquara e Caerana, até 357,5 Km entre as amostras dos Rios Água Verde e Mongaguá. A partir destes valores foram desenvolvidas análises de correlação estatística e identificadas correlações positivas entre todas as amostras estudadas e das amostras do Alto Iguaçu em relação àquelas da Planície Costeira. Isoladamente entre as amostras de *M. microlepis* do Alto Iguaçu e entre as da Planície Costeira, a correlação apresentada não possui nenhum suporte estatístico. A AMOVA evidenciou que 61,32% da diversidade genética encontra-se entre as amostras estudadas. Além disso, foi identificado o índice de fixação intraespecífica da diversidade genética ( $\Phi_{ST}$  global) igual a 0,59766, o  $N_m$  (número de migrantes por geração) igual a 0,3235 e o  $G_{ST}$  (diversidade genética entre populações) igual a 0,6071. Valores de  $N_m$  e  $G_{ST}$  entre as amostras do Alto Iguaçu e da Planície Costeira foram igualmente determinados sendo respectivamente, 0,5804 e 0,4828 e, 0,4019 e 0,5544. Além destes, os valores de  $N_m$  e  $G_{ST}$  pareados foram determinados entre todas as amostras estudadas e os mesmos variaram, respectivamente, desde 0,287 até 1,557 e de 0,243 até 0,635. As análises de distância genética e de parcimônia evidenciaram a

ocorrência de dois estoques genéticos: Alto Iguaçu e Planície Costeira. Além disso, foi também evidenciada a ocorrência de oito unidades genético-evolutivas: (1) rio Água Verde, (2) rio Pequeno, (3) rio da Várzea, (4) rio Piraquara, (5) rio Acarai, (6) rio Ribeirão (7) rio Mongaguá e (8) rio Caixa d'Água. Além destas unidades, a amostra de *M. microlepis* do rio Caerana apresentou-se como uma unidade genética distinta, porém sem identidade evolutiva própria. Estas sete unidades parecem estar inseridas dentro de quatro áreas biogeográficas naturais: (1) Alto Iguaçu, (2) Planície Costeira paranaense, (3) Planície Costeira do Norte de Santa Catarina e (4) Planície Costeira Sul de São Paulo. Além destes resultados foi identificada, por meio de evidências genéticas, evolutivas, geográficas e filogeográficas a ocorrência de unidades evolutivamente significativas ao longo das regiões amostradas na Planície Costeira. Assim, a origem e a evolução do complexo da Serra do Mar, ao longo da região estudada, e potencialmente em outras regiões, pode estar associada à diversificação de *M. microlepis*. Tal evidência faz com que as áreas relativas ao Alto Iguaçu, Planície Costeira do Sul do estado de São Paulo, Planície Costeira paranaense e Planície Costeira Norte de Santa Catarina tenham necessidades diferenciais em relação a um planejamento de conservação dos ambientes de Mata Atlântica ao longo de toda região estudada.

## ABSTRACT

Phylogeographical inferences can contribute to studies in ecology and evolution through the identification of evolutionarily independent regions, as well as by providing an evolutionary and geographical context for different species and their populations, and by allowing for the identification and the relationship among areas. In this context, the evolutionary and ecological history of *Mimagoniates microlepis* in the First Plateau of the State of Paraná (Upper Iguaçu) and the Coastal Plains was reconstructed using RAPD markers. Ten samples from each of ten different creeks were analyzed. The general genetic diversity of the species was estimated to be 95.4%. The genetic variability in relation to the total loci demonstrated that the Caerana river was the one that contributed the most to the general estimated genetic diversity (45.04%), whereas the rivers Acaraí (21.62%), Água Verde (21.62%) and da Várzea (20.72%) were the ones that contributed the least. On the other hand, the genetic diversity of each sampled group indicated that the Mergulhão river showed the highest intrapopulation genetic diversity (80.39%), whereas the Araraí river showed the lowest value (44.44%). The average genetic distances varied from 0.221, between the Mongaguá and Caixa d'Água rivers, to 0.461, between the Água Verde and Mongaguá rivers. The relative geographical distances among the studied locations varied between 2.2 km, between the Piraquara and Caerana rivers, to 357.5 km, between the Água Verde. From those values, analyses of statistical correlation identified positive correlations between all studied samples and the samples from the Upper Iguaçu in relation to those of the Coastal plains. Contrary to the other samples of *M. microlepis* of the upper Iguaçu among those of the Coastal Plains, the observed correlation did not show any statistical support. An AMOVA indicated that 61.43% of the genetic diversity was observed between the studied samples. In addition, the intraspecific fixation index of the genetic diversity (global  $\Phi_{ST}$ ) was estimated to be 0.59766, the  $N_m$  (number of migrants per generation) was estimated as 0.3235, and the  $G_{ST}$  (genetic diversity among population) was estimated as 0.6071.  $N_m$  and  $G_{ST}$  values among the samples from the Upper Iguaçu and the Coastal Plains were determined as 0.5804 and 0.4828, and 0.4019 and 0.5544, respectively.  $N_m$  and  $G_{ST}$  values in other sites varied from 0.287 to 1.557, and from 0.243 to 0.635, respectively. Genetic distance and parsimony analyses indicated the presence of two genetic stocks: the Upper Iguaçu and the Coastal Plains. In addition, eight genetic-evolutionary units have been identified: (1) Água Verde river, (2)

Pequeno river, (3) Várzea river, (4) Piraquara river, (5) Acaraí river, (6) Ribeirão river, (7) Mongaguá river, and (8) Caixa d'Água river. In addition to those units, the sample of *M. microlepis* from the Caerana river was identified as a distinct evolutionary unit, although without its own genetic identify. These seven units seem to be distributed among four natural biogeographical areas: (1) Upper Iguaçu, (2) Coastal Plain of the State of Paraná, (3) Coastal Plain of the Northern State of Santa Catarina, and (4) Coastal Plain of the Southern State of São Paulo. Moreover, genetic, evolutionary, geographical, and phylogeographical evidence identified evolutionarily significant units throughout the sampled regions on the Coastal Plains. Therefore, the origin and evolution of the Serra do Mar complex throughout the studied region, and potentially in other regions, can be associated with the diversification of *M. microlepis*. Such evidence indicates that the areas corresponding to the Upper Iguaçu, the Coastal Plains of Southern State of São Paulo, the Coastal Plains of the State of Paraná, and the Coastal Plains of the Northern State of Santa Catarina should receive differential care in relation to the planning for the conservation of environments of the Atlantic Rainforest along the entire studied region.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Princípios da filogeografia

A filogeografia é o campo de estudos envolvido com os princípios e os processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genéticas, especialmente aquelas dentro e entre as espécies (Avice, 2000).

Inferências filogeográficas podem contribuir para um amplo estudo de ecologia e evolução em vários aspectos, tal como a identificação de regiões evolutivamente independentes. Tais abordagens ainda podem fornecer um contexto evolutivo e geográfico para as espécies e populações, compreendendo as comunidades ecológicas e assim permitindo a determinação das influências históricas e espaciais nas amostras de riquezas de espécies (Ricklefs & Schluter, 1993; Bermingham & Moritz, 1998). Um terceiro potencial dos estudos filogeográficos é o de permitir um entendimento e a identificação da história de áreas isoladas evolutivamente, podendo assim orientar estratégias e as prioridades para a conservação das mesmas (Bermingham & Moritz, 1998; Moritz, 2002.)

Em síntese, a filogeografia tem sido bem mais utilizada acerca do entendimento das distribuições geográficas, das relações filogenéticas e genéticas entre linhagens evolutivas de animais, além de sugerir padrões de biogeografia regional e/ou das áreas de endemismo.

Exemplos de estudos filogeográficos, que discutem o panorama evolutivo de grandes áreas podem ser identificados, tais como os estudos de peixes do extremo Norte da América do Norte (Bernatches & Wilson, 1998) e das Américas Central e do Sul (Bermingham & Martin, 1998; Perdices *et al.*, 2005), além daqueles de conservação de pequenos mamíferos amazônicos (da Silva & Patton, 1998) e da identificação de rotas de colonização pós-glacial na Europa e na América do Norte (Taberlet *et al.*, 1998; Brant & Ortí, 2003). Estes estudos, de maneira geral, demonstram a importância da combinação de marcadores moleculares de DNA com evidências geográficas, independentes do panorama histórico obtido da geologia e paleopalínologia. (Bermingham & Moritz, 1998).



## 1.2 Características biológicas de *Mimagoniates microlepis*.

O gênero *Mimagoniates* é constituído por seis espécies: *M. inequalis*, *M. barberi*, *M. lateralis*, *M. microlepis*, *M. sylvicola*, *M. reocharis* (Weitzman *et al.*, 1988; Menezes & Weitzman, 1990). Este gênero apresenta-se amplamente distribuído pelos riachos da área costeira e naqueles mais interiores da Mata Atlântica, exibindo um padrão de endemismo desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Weitzman *et al.*, 1988). *Mimagoniates* é grupo irmão do gênero *Glandulocauda*, formando um grupo monofilético e irmão de *Lophiobrycon weitzmani*, compondo, por sua vez, a tribo Glandulocaudini (Castro *et al.*, 2003).

A espécie *Mimagoniates microlepis* (Teleostei, Characidae, Glandulocaudinae) distribui-se desde a região norte do estado do Espírito Santo até a região nordeste do estado do Rio Grande de Sul (Weitzman *et al.*, 1988). No estado do Paraná, esta espécie se distribui ao longo da Planície Costeira e pelos riachos componentes das nascentes do rio Iguaçu. Recentemente foi identificada a sua ocorrência também em dois riachos componentes das nascentes do rio Tibagi (Santana *et al.*, 2006).

*Mimagoniates microlepis* caracteriza-se, ainda, por ser grupo irmão de *M. rheocharis*, e parece ter evoluído mais recentemente ao longo da diversificação do gênero (Menezes & Weitzman, 1990). Os representantes de *M. microlepis* apresentam tamanho relativamente pequeno, medindo entre três e oito centímetros de comprimento padrão nos adultos (Weitzman *et al.*, 1988; dados de campo do presente estudo). De acordo com Mazzoni & Iglesias-Rios (2002), a distribuição geográfica de *M. microlepis* parece estar associada à cobertura vegetal, a variáveis ambientais e à disponibilidade de alimento e abrigo. A espécie apresenta hábito alimentar constituído basicamente por artrópodes alóctones, principalmente insetos e microcrustáceos (Lampert *et al.*, 2003).

Com relação às características genéticas, *M. microlepis* apresenta o número diplóide de 52 cromossomos. Por outro lado, marcantes diferenças nas fórmulas cariotípicas são observadas entre amostras oriundas do Alto Iguaçu e da região Sudeste/Sul da Planície Costeira (Guimarães *et al.*, 1995; Nardino, 2004; Motta, 2004). Nas amostras oriundas da Planície Costeira Sudeste/Sul é ainda reconhecida uma boa diversidade quanto ao número e a posição das NORs (regiões organizadoras de nucléolo – cístrons ribossomais) (Guimarães *et al.*, 1995). Tem

sido considerado por diversos autores (Galetti Jr. *et al.*, 1984; Amemyia & Gold, 1988; Venere & Galetti Jr., 1989, Torres *et al.*, 1998 e Torres *et al.*, 2004) que a variação de número e posição das NORs sejam marcadores cromossômicos para o nível de espécie. Assim, a reorganização dos genomas no nível cromossômico das populações de *M. microlepis*, associada a um eventual isolamento, pode ter conduzido as mesmas, ao longo do tempo, a ser tornarem unidades evolutivamente independentes.

### **1.3 Marcadores moleculares RAPD em peixes neotropicais associados a questões geográficas.**

Marcadores moleculares são fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos ou grupo de indivíduos geneticamente diferentes (Borém & Santos, 2001).

O protocolo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), desenvolvido paralelamente por Williams *et al.*, (1990) e Welsh & McClelland (1990), baseia-se na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), desenvolvida por Saiki *et al.*, (1985) e Mullis & Faloona (1987). Tal metodologia utiliza *primers* com seqüências arbitrárias, eliminando assim a necessidade de se conhecer previamente a seqüência que flanqueia a região que será amplificada. Da variação obtida com o uso de marcadores RAPD, é possível obter evidências acerca da semelhança genética entre indivíduos, da conectividade geográfica e diversidade em populações, além de aspectos relativos a ecologia, evolução e padrões demográficos populacionais (Hadrys *et al.*, 1992; Parker *et al.*, 1998; Chen & Borowsky, 2004).

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1995), a principal limitação dos marcadores de RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco, uma vez que se trata de um marcador dominante e, portanto, não permite a detecção de genótipos heterozigotos. Por outro lado, entre as vantagens dos marcadores RAPD, está a possibilidade de detecção de variação sem a necessidade de conhecimento prévio das seqüências acessadas e, principalmente, por constituir-se em um método simples e confiável de acesso e estimativa da variação genômica das espécies, uma vez que permite o exame de uma quantidade ilimitada de locos ao mesmo tempo (Lynch & Milligan, 1994; Ali *et al.*, 2004).

Por conta de suas vantagens, os marcadores moleculares RAPD têm sido rotineiramente utilizados em estudos de peixes neotropicais, tendo o propósito, de contribuir para estudos sistemáticos, populacionais e de conservação, permitindo orientar estratégias de preservação da sua diversidade. Estas contribuições podem ser evidenciadas com alguns exemplos.

Dergam *et al.* (1998) utilizaram os padrões de similaridade de marcadores genômicos do tipo RAPD-PCR para verificar os níveis de diferenciação genética de populações de *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) nos rios Iguaçu, Tibagi e Paraná. Os autores observaram que entre as populações dos rios Paraná e Tibagi ocorre um elevado índice de diversidade genética, sugerindo a ocorrência de espécies diferentes nestes rios. Outro dado obtido foi a presença de todos os alelos, encontrados nas populações da cabeceira do rio Tibagi, também nas amostras do rio Iguaçu. Tal semelhança permitiu sugerir que a população da cabeceira do rio Tibagi possa ser a origem da população amostrada no rio Iguaçu.

Dergam *et al.*, (2002) usaram dos marcadores RAPD-PCR, associados à análise de haplótipos do DNA mitocondrial para entender as relações filogeográficas de *H. malabaricus* nos rios Doce, Grande e Macau. Na bacia do rio Doce, as similaridades genéticas para marcadores RAPD-PCR sugeriram a existência de dois grupos geneticamente diferentes: um composto por populações lacustres do rio Carioca e do rio Dom Helvécio e a outra formada pelos demais rios que compõe a bacia do rio Doce. As diferenças observadas pelas análises de RAPD-PCR puderam ser explicadas devido à existência de sub-bacias dentro deste sistema lacustre. Uma árvore filogenética de máxima parcimônia, elaborada com dados de fragmentos de citocromo b, sugere que as traíras (*H. malabaricus*) do rio Doce dividem uma complexa história biogeográfica com as bacias vizinhas. Tais resultados corroboram a hipótese de separação do sistema de drenagem composto pelos rios Doce, Paraíba do Sul e Grande, pelo divisor de águas formado pela Serra da Mantiqueira durante o período Plio-Pleistoceno.

Outro exemplo da utilização de marcadores moleculares para os fins de estimar a diversidade de uma espécie de peixe neotropical, ao longo de suas distribuições geográficas foi realizado por Hatanaka & Galetti (2003). Estes autores detectaram a variação genética de *Prochilodus marginatus* na área de influência da represa de Três Marias (MG) no rio São Francisco em três pontos: ponto “A” logo abaixo da represa, ponto “B” aproximadamente 10 Km da represa até a confluência

do rio Abaeté e rio São Francisco e o ponto “C” localizado a 20 Km abaixo da confluência citada acima. Marcadores RAPD-PCR indicaram uma variação genética considerável entre indivíduos do ponto “A” e “C”, sendo que os peixes da região mais baixa do ponto “C” (região mais afastadas da represa) são mais similares entre si, do que aqueles dos outros locais amostrados. Estes dados indicaram ainda a ocorrência de uma população estruturada, o que sugere implicações importantes para a conservação da variabilidade genética de distintos estoques de *P. marggravii*.

Almeida *et al.* (2003), objetivando gerarem dados acerca de estruturação genética de populações, para os fins de orientação de condutas de conservação de peixes dos rios Tietê e Paranapanema no estado de São Paulo, estudaram amostras de *Pimelodus maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae). Tais amostras foram coletadas em três pontos dos rios acima mencionados: alto, médio e baixo. As análises dos marcadores RAPD revelaram a inexistência de estruturação genética para as amostras do rio Tietê, bem como entre aquelas nativas do médio e baixo Paranapanema. Por outro lado, foi constatada a ocorrência de uma diferenciação genética entre a amostra do alto Paranapanema e as demais do mesmo rio. Tais dados motivaram os autores ainda a sugerir a panmixia das amostras do rio Tietê, bem como entre aquelas do médio e baixo Paranapanema, ao contrário do que é sugerido entre a amostra do alto Paranapanema e as demais do mesmo rio.

Chen & Borowsky (2004), utilizaram as variações dos perfis RAPD para entender a história filogeográfica de duas espécies de Cyprinodontiformes Norte Americanos. *Xiphophorus variatus* e *Heterandria jonesi* são duas espécies de poecilídeos do México e apresentam distribuições geográficas sobrepostas. No trabalho foram observados três agrupamentos genéticos bem definidos e diretamente associados a padrões de distribuição geográfica que coincidiram para as duas espécies. Além destes dados, divisões filogenéticas foram observadas entre as amostras das regiões Norte e Sul do México, também coincidentes para as duas espécies. A associação supra mencionada dos dados com os cladogramas de área sugeriu que barreiras geográficas conduziram a um padrão filogeográfico comum para as duas espécies.

Ainda em relação à ordem Cyprinodontiformes, em especial a família Rivulidae, foi estudada, por meio de RAPD, a diferenciação genética entre as 3 espécies constituintes do gênero *Cynolebias*: *C. viarius*, *C. adloffii* e *C. cf. adloffii*. Por

dois métodos de análise de agrupamento (UPGMA e Parcimônia), foram identificados 4 grupos genéticos, e evolutivamente diferenciados. *Cynolebias cf. adloffii* parece ser uma unidade genética que necessita de um tratamento taxonômico diferenciado, mesmo tendo sido composto por duas unidades genética e evolutivamente distintas (García *et al.*, 2004).

Mamuris *et al.* (2005) estudaram a variação genética de nove populações de *Ladigesocypris ghigii* (Cyprinidae), pertencentes a sete sistemas diferentes de riachos e de um reservatório de água da ilha de Rhodes (Grécia). Essas populações foram estudadas com base de dados do mtDNA e do DNA nuclear, a fim sugerir ações de conservação para a espécie. As análises de RAPD revelaram níveis extremamente baixos de variação intrapopulacional. As estimativas de  $F_{ST}$ , para as nove populações, sugeriram uma estrutura genética diferenciada entre as populações estudadas. Os dados sugerem que o valor de divergência genética entre as populações do *L. ghigii* é significativo. Além disso, a fixação intraespecífica de marcadores de RAPD indicam um isolamento genético substancial das populações.

Como mencionado anteriormente, no estudo realizado por Menezes (1988), as espécies de *Mimagoniates* parecem exibir um padrão de endemismo muito grande ao longo da Planície Costeira. As populações de *M. microlepis* no estado do Paraná encontram-se separadas pela Serra do Mar que, segundo Asmus & Ferrari (1978), teve sua formação associada a processos tectônicos de movimentação vertical, ocorridos na era cenozóica. Tais movimentos deram origem a este sistema de montanhas que se estende desde o Rio de Janeiro ao norte de Santa Catarina por aproximadamente 1.000 quilômetros de extensão.

No Paraná, esta cadeia montanhosa apresenta cimos elevados de até 1.800m de altitude (Almeida & Carneiro, 1998). Devido às elevadas altitudes mencionadas e a sua fisiografia, este sistema caracteriza um divisor de águas no estado. Tal situação permite testar a Serra do Mar como uma possível barreira geográfica natural ao fluxo gênico entre populações de *M. microlepis* da Planície Costeira e do Primeiro Planalto Paranaense.

A presença de barreiras geográficas, tal como mencionado acima, isola populações de peixes, podendo gerar variações intraespecíficas e divergências genômicas entre as populações ao longo do tempo. Tal fato pode ser evidenciado nos resultados apresentados pelo trabalho de Guimarães *et al.* (1995), na qual são

constatadas diferenças nas estruturas cariotípicas de populações de *M. microlepis*, que se encontram isoladas em diferentes rios da região costeira do sudeste brasileiro.

O estudo aqui apresentado objetivou gerar dados moleculares que possibilitem contribuir para o entendimento da história evolutiva e ecológica de *M. microlepis*. De forma específica, objetivou-se a interpretação das relações genéticas e dos padrões filogeográficos de amostras oriundas do Primeiro Planalto Paranaense e da Planície Costeira, nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, utilizando para tal abordagem os marcadores moleculares de DNA do tipo RAPD.

Para alcançar o objetivo geral mencionado acima, foram estabelecidas algumas metas, tais como:

- I. Gerar dados moleculares (DNA) que permitissem distinguir populações de *M. microlepis* geneticamente diferentes.
- II. Avaliar a variabilidade genética das populações de *M. microlepis* nas regiões destacadas acima;
- III. Verificar o efeito da Serra do Mar, como barreira geográfica, sobre a distribuição e a eventual diversificação destas populações, pelos eventos vicariantes envolvidos na formação das nascentes do rio Iguaçu e na própria origem da Serra do Mar.

Dessa forma, tais metas permitiram responder às seguintes perguntas:

- 1- Existe diversidade genética nuclear entre as populações de *M. microlepis*?
- 2- As amostras de *M. microlepis* dos diferentes rios constituem-se como populações distintas umas das outras?
- 3- Há fluxo gênico entre as populações? Se houver como isto está ocorrendo?
- 4- A Serra do Mar representa uma barreira geográfica natural entre as populações estudadas?
- 5- As populações de *M. microlepis* se encontram hoje em processo de especiação?

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

O material aqui analisado foi coletado entre março e novembro de 2004, utilizando-se peneiras e pequenas redes de arrasto manual em dez rios de nove diferentes localidades da região Sudeste/Sul do Brasil. Assim, foram obtidas amostras a partir de riachos de dois municípios do estado de São Paulo localizados na Planície Costeira (Mongaguá e Itariri), de riachos de 5 municípios do estado do Paraná, sendo dois da Planície Costeira (Paranaguá e Antonina) e três pertencentes ao Primeiro Planalto Paranaense – Alto Iguaçu – (Piraquara, São José dos Pinhais e Lapa). Além destes pontos amostrais, foram coletados exemplares de *M. microlepis* oriundos de riachos de dois municípios do estado de Santa Catarina, sendo um pertencente a Planície Costeira (São Francisco do Sul) e outro localizado acima da Serra do Mar (Canoinhas), (Figura 2, Tabela 1).

Os exemplares de *M. microlepis* (Figura 1) coletados foram identificados taxonomicamente, seguindo à chave proposta por Menezes & Weitzman (1990). Os mesmos foram processados em laboratório e amostras de músculos, fígado e nadadeiras de cada espécime foram imersas em Etanol 96% e mantidas a temperatura de -20°C. Exemplares testemunhos encontram-se depositados na coleção de referência de peixes do Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI), sob a curadoria do Dr. Vinicius Abilhoa.

Para os estudos genéticos das populações foram utilizados 10 (dez) espécimes de cada localidade entre machos e fêmeas.

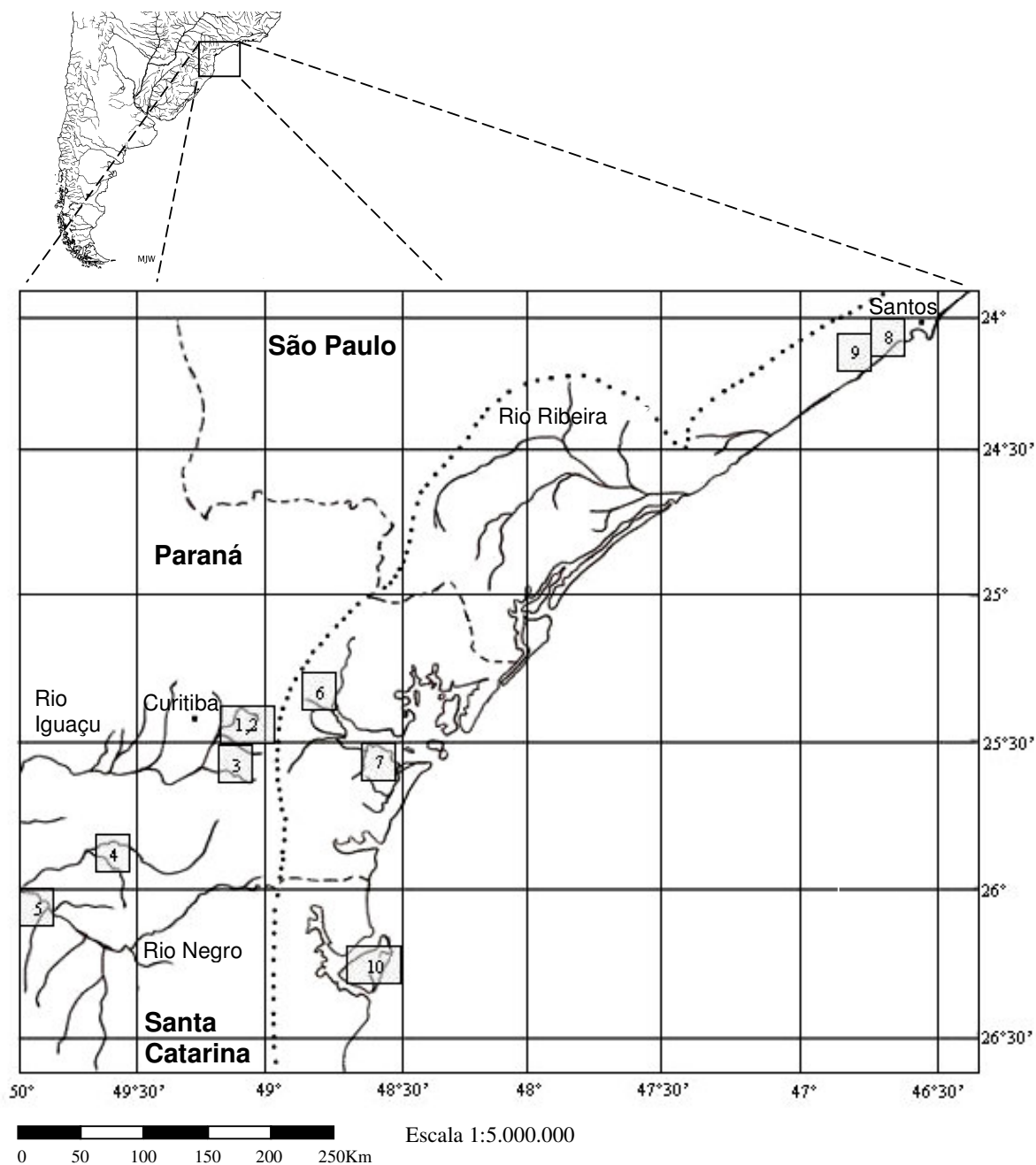


**Figura 1.** Exemplar de *Mimagoniates microlepis* com cerca de 7cm de comprimento total, como forma de demonstração da espécie estudada.

**Tabela 1.** Rios e as respectivas localidades amostradas de *Mimagoniates microlepis* (para maiores detalhes consultar as Figuras 2, 3, 4, 5 e 6). As siglas da coluna “amostras” descrevem as localidades estudadas: PIR= rio Piraquara; CAE= rio Caerana; PEQ= rio Pequeno; VAR= rio da Várzea; AGU= rio Água Verde; MER= rio Mergulhão; RIB= rio Ribeirão; MON= rio Mongaguá; ITA= rio Caixa d’Água; ACA= rio Acaraí. PPP= Primeiro Planalto Paranaense; PSC= Planalto de Santa Catarina; PC= Planície Costeira

Amostras	N° da localidade	rio/Localidade	Região	Coordenadas geográficas
PIR	1	rio Piraquara; Piraquara-PR	PPP	25°29'59"S-49°02'58"W
CAE	2	rio Caerana; Piraquara-PR	PPP	25°26'59"S-49°02'31"W
PEQ	3	rio Pequeno; São José dos Pinhais-PR	PPP	25°33'32"S-49°07'41"W
VAR	4	rio da Várzea; Lapa-PR	PPP	25°52'57"S-49°43'26"W
AGU	5	rio Água Verde; Canoinhas-SC	PSC	26°12'44"S-49°23'35"W
MER	6	rio Mergulhão; Antonina-PR	PC	25°17'58"S-48°44'39"W
RIB	7	rio Ribeirão; Paranaguá-PR	PC	25°35'21"S-48°36'40"W
MON	8	rio Mongaguá; Mongaguá-SP	PC	24°05'30"S-46°36'46"W
ITA	9	rio Caixa d’Água; Itariri-SP	PC	24°17'54"S-46°46'46"W
ACA	10	Afluente do rio Acaraí; S.Francisco do Sul-SC	PC	26°17'33"S-48°35'20"W





**Figura 2.** Mapa da América do Sul (acima, à esquerda) indicando a região de estudo. Os numeros representam a posição relativa dos locais de amostragem de *Mimagoniates microlepis*: 1 rio Piraquara, 2 rio Caerana, 3 rio Pequeno, 4 rio da Várzea, 5 rio Água Verde, 6 rio Mergulhão, 7 rio Ribeirão, 8 rio Mongaguá, 9 rio Caixa d'Água e 10 afluente do rio Acaraí. A linha pontilhada representa o perfil da cadeia montanhosa da Serra do Mar ao longo dos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Extração do DNA

Amostras da musculatura foram utilizadas como fonte de material genético e foram extraídos os DNAs de dez espécimes de *M. microlepis* de cada uma das dez localidades amostradas. Os procedimentos de extração do DNA seguiram os passos metodológicos propostos Sambrook & Russel (2001), somados a algumas sugestões segundo Almeida *et al.*, (2001) e a algumas poucas adaptações aqui desenvolvidas, conforme mencionado a seguir.

Portanto, os passos metodológicos constituíram-se em:

1. Fragmentar uma amostra tecidual de 0,5cm<sup>3</sup> em uma placa de petri autoclavada;
2. Colocar o tecido fragmentado em um microtubo de 1,5ml autoclavado;
3. Executar um esmagamento dos fragmentos teciduais objetivando a sua melhor trituração;
4. Adicionar 700µl de tampão TE9 + SDS (Tris-HCl 500mM, pH 8,0, EDTA 20mM, NaCl 10mM,), SDS (1%; dodecil sulfato de sódio) e 5µl de proteinase K (20mg/µl em Glicerol 5%) em cada microtubo com o tecido triturado;
5. Homogeneizar manualmente a solução pela inversão dos microtubos por cerca de 50 vezes;
6. Incubar os microtubos com as amostras em banho-maria por 24h a 60°C. As soluções devem ser homogeneizadas suavemente a cada 15-20 minutos, quando possível. Esta fase tem como finalidade promover a digestão de componentes celulares como lipídeos, proteínas e RNA.
7. Passadas as 24h, adicionar a cada microtubo, 700µl de fenol tamponado e homogeneizar os microtubos pela inversão dos mesmos com fortes movimentos laterais do antebraço por umas 12 vezes;
8. Centrifugar por 10 minutos a 10.000rpm;
9. Retirar o sobrenadante de cada microtubo e transferir a outros microtubos estéreis;
10. Adicionar 700µl de clorofane (1-Fenol tamponado:1-Clorofórmio) e homogeneizar os microtubos (como no item 7);

11. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm e novamente transferir o sobrenadante de cada microtubo para outros microtubos estéreis;
12. Adicionar 700µl de clorofil (24-Clorofórmio:1-Álcool isoamílico) e homogeneizar os microtubos pela inversão suave dos mesmos por umas vinte vezes;
13. Centrifugar por 10 minutos a 10.000rpm e novamente retirar o sobrenadante de cada microtubo e transferir para outros microtubos estéreis;
14. Adicionar mais 10% do seu volume de NaCl 3M, e 2x1/2 do seu volume de etanol absoluto gelado;
15. Inverter suavemente os microtubos por umas quarenta vezes, até a precipitação do DNA nos microtubos;
16. Manter os microtubos no freezer por aproximadamente 12h a -20°C;
17. Ao término deste período, Centrifugar os microtubos por 15 minutos a 12.000rpm;
18. Desprezar o sobrenadante invertendo os microtubos em uma placa de petri;
19. Lavar o DNA colocando pela parede do microtubo etanol 70% gelado (100µl);
20. Retirar o excesso de álcool dos microtubos (proceder como no item 18);
21. Deixar os microtubos abertos à temperatura ambiente por aproximadamente 2h para secar;
22. Após este período os *pellets* de DNAs devem ser solubilizados em tampão T.E (Tris-HCl 3mM, pH 8,0, EDTA 0,2mM) +/- 200µl por microtubo conforme o tamanho do *pellet*;
23. Quantificar o DNA extraído para se determinar uma solução de uso de 5ng/µl.

### 2.2.2 Marcadores RAPD

Foram testados antecipadamente 45 *primers* (OPA 1-10; OPAC 1-9; OPAM 1-15; OPW 1-7; OPX 2, 4, 10, 18, 20, 21/Operon Technologies) em cinco amostras de *M. microlepis* de diferentes riachos: rio Piraquara, rio Caerana e rio Pequeno (Primeiro Planalto Paranaense), rio Mergulhão e rio Acaraí (Planície Costeira).

Foram utilizados dois espécimes de cada população para selecionar uma amostra inicial de dez *primers*. Destes, foram escolhidos 6 *primers* (OPA2, OPAM07, OPAM13, OPW5, OPX04 e OPX18; Tabela 2), por apresentarem um bom padrão de amplificação para a obtenção dos perfis RAPD. Cabe mencionar que os

perfis RAPD obtidos para as amostras aqui estudadas foram reproduzidos pelo menos duas vezes.

**Tabela 2.** Seqüências nucleotídicas dos *primers* utilizados no presente estudo.

<b>Primers</b>	<b>Seqüências</b>
OPA2	5' GTTGCGATCC 3'
OPAM07	5' AACCGCGGCA 3'
OPAM13	5' CACGGCACAA 3'
OPW5	5' GGCGGATAAG 3'
OPX04	5' CCGCTACCGA 3'
OPX18	5' GACTAGGTGG 3'

### 2.2.3 Protocolo da PCR

As amplificações foram realizadas, seguindo os passos sugeridos por Almeida *et al.*, (2003) e estão descritas na Tabela 3. Para tanto foi utilizado o termociclador da marca Eppendorf, modelo *personal*.

**Tabela 3.** Parâmetros utilizados no termociclador para a realização do PCR.

	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
<b>Denaturação inicial</b>	92°C 40 ciclos	4 minutos
<b>Denaturação</b>	92°C	40 segundos
<b>Anelamento</b>	40°C	90 segundos
<b>Extensão</b>	72°C	120 segundos
<b>Extensão final</b>	72°C	5 minutos

Cabe destacar que a montagem das reações de PCR foram estabelecidas para 21 amostras de cada vez (10 espécimes de um rio + 10 espécimes de um outro rio + controle negativo). Tal conduta foi implementada tendo em vista a facilitar a tomada dos reagentes para a montagem do *mix*. A quantidade em volume (µl) e as concentrações dos reagentes estão descritas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Componentes da reação de amplificação do DNA e suas respectivas concentrações e volumes.

Reagentes	Para 1 (um) microtubo
Água ultrapura autoclavada	3,82µl
Tampão 10x	1,5µl
dNTP (0,25mM)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (3mM)	4,5µl
Taq polimerase (1u/ µl)	0,18µl
Primer (0,25mM)	1,5µl
DNA (5ng/ µl)	2µl
Volume total	15µl

Os produtos obtidos da amplificação do DNA (perfis RAPD) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,4% com uma corrente de 80V, por um período aproximado de 4 à 5 horas. Tanto no preparo do gel, quanto para a corrida eletroforética, foi utilizado o tampão TBE 0,5x, diluído de uma solução original de 10x (Tris 0,89M, Ácido Bórico 0,89M e EDTA 0,01M, pH= 8,3). Na eletroforese, além dos produtos de amplificação do DNA, foram utilizados 3µl de um marcador de peso molecular (100pb; Invitrogen). Posteriormente o gel foi corado em uma solução de Brometo de Etídeo por 20 minutos. Os géis, com os perfis RAPD obtidos, foram fotodocumentados em um sistema de captura de imagens da marca Vilber Lourmat. As bandas produzidas em cada amplificação e para cada indivíduo foram analisadas diretamente na imagem do gel capturado quanto à presença ou ausência e quanto à intensidade e tamanho, este estimado da comparação com um marcador de tamanho molecular padrão. Foram consideradas bandas homólogas todas que possuíam mesmo tamanho e posição no gel estando estas nítidas e/ou fortemente coradas. Os resultados foram transformados em uma matriz numérica binária [(0) marcador ausente; (1) marcador presente; Anexo I] e a elaboração da mesma foi conduzida por meio do uso do software NDE (Page, 2001).

#### 2.2.4 Análise dos dados

Para a identificação do patamar de diversidade genética de *M. microlepis*, foram considerados o número de locos total, o número de locos monomórficos, bem

como aqueles de natureza polimórfica. Mediante tais observações, foram determinados manualmente os percentis de monomorfismo e polimorfismo, considerando o número total de locos igual a 100%. Assim, o patamar de diversidade genética global de *M. microlepis* foi estabelecido, considerando o percentil de polimorfismo global.

Para a determinação da diversidade genética dentro de cada uma das amostras estudadas, em relação ao todo (10 amostras) de diversidade observada, foi considerado o número total de locos polimórficos, mediante o total de locos identificados. Já, para a determinação da diversidade genética dentro de cada uma das amostras estudadas, em relação ao total de diversidade presente em cada uma delas, foi considerado apenas o número de locos polimórficos de cada amostra, mediante o total de locos de cada uma delas.

O tratamento da matriz binária, pelo método de distância (NJ - Neighbor-Joining; Saitou & Nei, 1987), gerou a matriz de distância genética de Nei. A partir desta, foi estabelecida uma matriz das médias das distâncias genéticas entre todas as amostras, calculadas manualmente. Além disso, foram determinadas, em linha reta, as distâncias geográficas relativas entre todas amostras estudadas de *M. microlepis*. De posse dos valores de distância genética e de distância geográfica, foram conduzidas análises de correlação (correlação de Spearman), por meio do software Statistica v.6.0 (Statsoft Inc.), entre todas as amostras, somente entre as amostras do Alto Iguaçu, somente entre as amostras da Planície Costeira e entre as amostras do Alto Iguaçu em relação àquelas da Planície Costeira.

A matriz foi ainda analisada pelos métodos de distância [Neighbor-joining (NJ; Saitou & Nei, 1987)] e parcimônia (Fitch, 1971). A homologia dos caracteres (bandas) foi determinada à partir do peso molecular dos mesmos, considerando o *Ladder* (100pbs) como referência. A análise de distância foi desenvolvida por meio do uso do software Paup\* v.4.0b10 (Swofford, 2000), usando a interface gráfica PaupUp (Calendinni & Martin, 2005).

A análise de parcimônia foi conduzida por busca heurística, por meio do uso do software Nona v.2.0 (Goloboff, 2006), usando a interface gráfica Winclada v. 0.9.99 m24 (Nixon, 2000). Todos os caracteres foram designados como não-ordenados, com o peso equivalente. A adição das OTUs – *Operational Taxonomic Units* - foi randômica e a sua permuta por meio do algoritmo *tree-bisection-reconnection* (TBR), considerando *M. lateralis* como o grupo externo. Foi ainda

estabelecido um número máximo (*MaxTrees*) de 100.000 árvores com 5.000 replicações aleatórias. Foi ainda determinado o consenso estrito das árvores geradas.

Para ambas as análises (distância e parcimônia) foram ainda computadas, a partir de 1000 pseudoréplicas, os índices de suporte dos ramos de *Bootstrap* e *Jackknife*, seguindo a regra de consistência dos ramos igual ou maior ao percentil 50, por meio da opção de busca *fast stepwise addition*. A adição das OTUs também foi randômica e a sua permuta igualmente realizada por meio do algoritmo *tree-bisection-reconnection*. Todos os procedimentos supramencionados foram desenvolvidos por meio do uso dos softwares Paup\* v.4.0b10 (Swofford, 2000) e Nona v. 2.0 (Goloboff, 2006).

Para a análise de variância molecular (AMOVA), a matriz de dados foi submetida ao software AMOVAONLINE segundo Dyer (2005) e disponibilizado pelo autor em <http://dyer2.bio.vcu.edu>. Tal análise se baseia na obtenção da distribuição nula da variação, considerando toda a diversidade observada (matriz 0/1) como oriunda de uma única população (Excoffier *et al.*, 1992). Os componentes da variação foram estimados a partir de 1000 matrizes de permutação, conforme descrição de Excoffier *et al.*, (1992) e, a partir destes procedimentos foi estimado o  $Phi_{ST}$  (índice de fixação intraespecífica da diversidade genética).

Foram ainda determinados os parâmetros  $Nm$  (número de migrantes por geração) e  $G_{ST}$  (diversidade genética entre populações) globais, entre o Alto Iguaçu e a Planície Costeira, entre as amostras somente do Alto Iguaçu e entre as amostras somente da Planície Costeira, além daqueles relativos às comparações “par a par” mediante todas as amostras. Tais análises foram conduzidas por meio do uso do software PopGene v.1.32, segundo Yeh *et al.* (1999).

De posse de todos os valores referentes aos índices  $Nm$  e  $G_{ST}$  foram conduzidas análises de correlação (correlação de Spearman) entre todas as amostras, somente entre as amostras do Alto Iguaçu, somente entre as amostras da Planície Costeira e entre as amostras do Alto Iguaçu em relação àquelas da Planície Costeira. Tais análises foram conduzidas por meio do software Statistica v.6.0 (Statsoft Inc.)

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Perfis RAPD

Os seis *primers* utilizados amplificaram um total de 111 locos analisáveis (marcadores), considerando as dez amostras estudadas de *M. microlepis* (Figura 2 e Tabela 1). Os fragmentos de DNA variaram desde 250pb (pares de bases) até 3000pb (Figuras 7a-b, 8a-b). Dos 111 locos identificados, cinco foram monomórficos e 106 polimórficos. Tal observação revelou ainda uma estimativa global de diversidade genética da ordem de 95,4% para *M. microlepis* ao longo da região estudada. Foi ainda determinada a representatividade da diversidade genética de cada amostra em relação ao todo da diversidade observada e os índices variaram desde 20,72 até 45,04% (Tabela 5). Já a Tabela 6 apresenta o nível da diversidade genética própria de cada grupo amostral. Para tal avaliação foram consideradas apenas e isoladamente as bandas presentes nas amostras locais estudadas e, os índices variaram de 44,44 até 80,39%.

**Tabela 5.** Diversidade genética observada dentro de cada amostra de *M. microlepis*, em relação ao conjunto total de locos analisados. Ntl=nº total de locos; Nlv= nº de locos variantes; Dg= diversidade genética.

Rios Amostrados	Ntl	Nlv	Dg%
Piraquara	111	33	29,72
Caerana	111	50	45,04
Pequeno	111	41	36,93
Várzea	111	23	20,72
Água Verde	111	24	21,62
Mergulhão	111	41	36,93
Ribeirão	111	44	39,63
Mongaguá	111	35	31,53
Caixa d'Água	111	41	36,93
Acaraí.	111	24	21,62



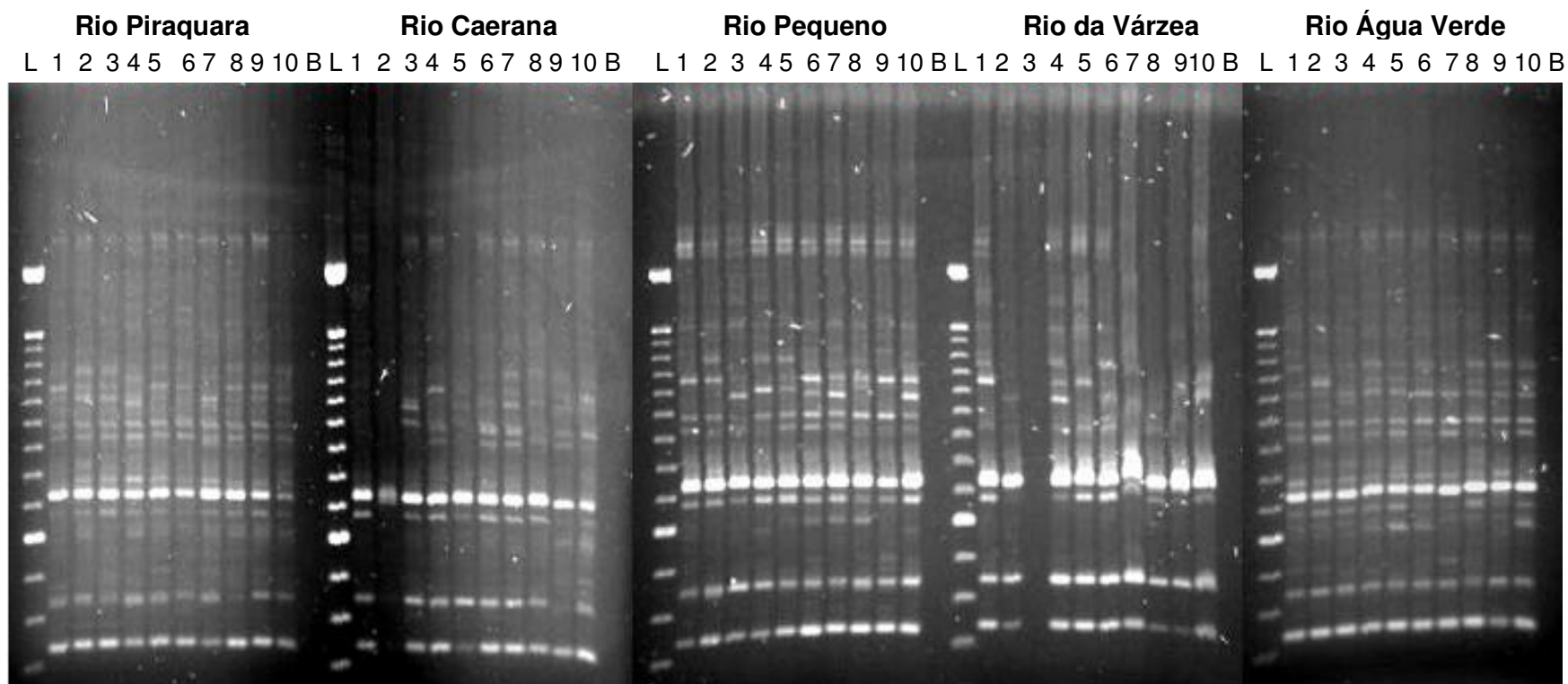
**Tabela 6.** Diversidade genética observada dentro de cada amostra de *M. microlepis*, em relação ao conjunto total de locos presentes em cada amostra. Ntl= nº total de locos presentes em cada amostra; Nlv= nº de locos variantes em cada amostra; Dg= diversidade genética.

Rios Amostrados	Ntl	Nlv	Dg(%)
Piraquara	69	32	46,37
Caerana	64	50	78,10
Pequeno	61	41	67,21
Várzea	37	23	62,16
Água Verde	51	24	47,05
Mergulhão	51	41	80,39
Ribeirão	62	44	70,96
Mongaguá	53	35	66,03
Caixa d'Água	58	41	70,68
Acaraí.	54	24	44,44

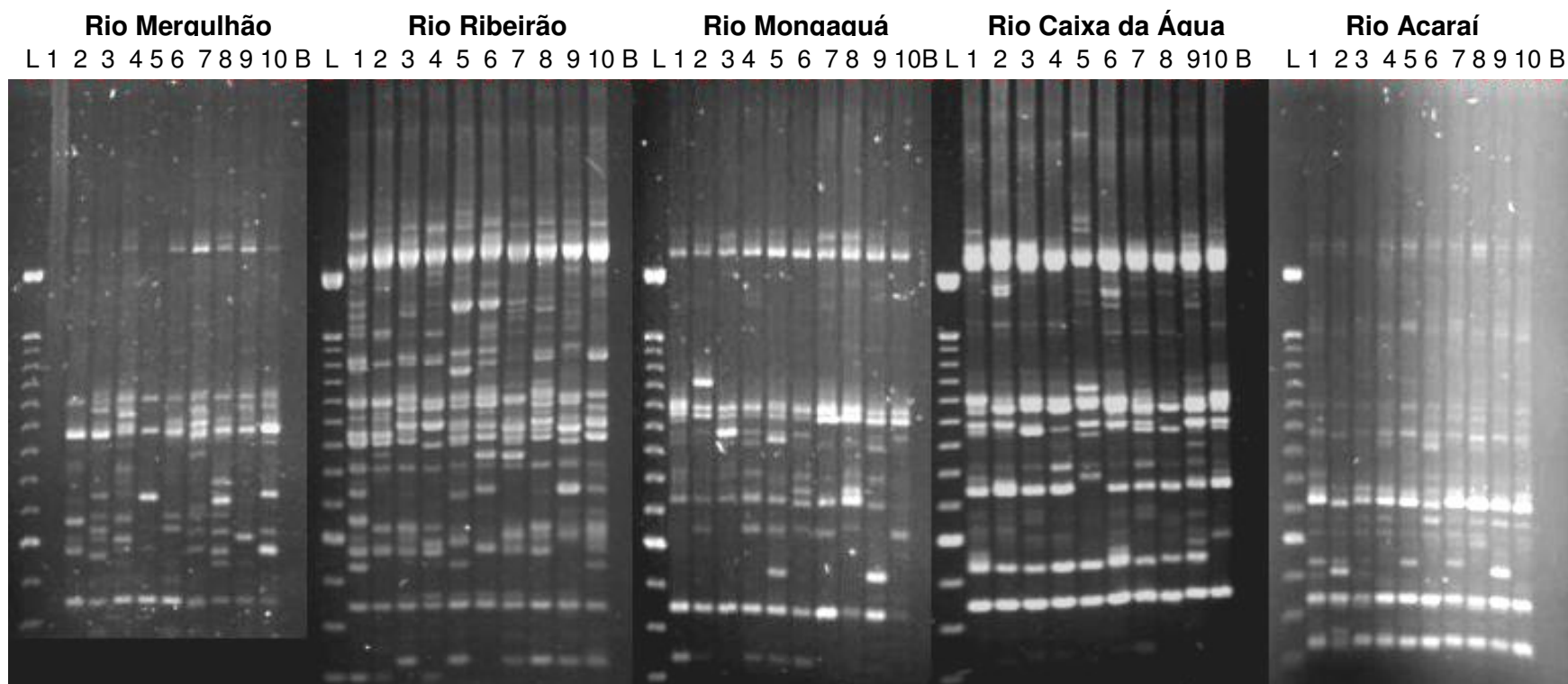
Pela análise de distância foi possível observar índices específicos de distanciamento genético entre as *OTUs*. Tais índices variaram desde 0,03604 (entre exemplares *M. microlepis* do rio da Várzea e do rio Água Verde) até 0,54955 (entre um exemplar *M. microlepis* do rio Pequeno e outro do rio Mongaguá) – Anexo II. Na Tabela 7 são identificados (acima da diagonal) os valores médios das distâncias genéticas de Nei (Nei, 1972) entre as amostras estudadas e, estas variaram desde 0,221 entre as amostras de *M. microlepis* dos rios Mongaguá (Mongaguá, SP) e Caixa d'Água (Itariri, SP) até 0,461 entre as amostras dos rios Água Verde (Canoinhas, SC) e Mongaguá (Mongaguá, SP). Abaixo da diagonal são apresentadas as distâncias geográficas relativas (em linha reta) entre as amostras estudadas que variaram desde 2,2 até 357,5 quilômetros, respectivamente entre os rios Piraquara e Caerana, ambos em Piraquara (PR) e entre os rios Água Verde (Canoinhas, SC) e Mongaguá (Mongaguá, SP).

**Tabela 7.** Médias das distâncias genéticas (Nei, 1972) obtidas entre as amostras estudadas de *Mimagoniates microlepis* (acima da diagonal). Distância geográfica relativa (km) entre as amostras estudadas (abaixo da diagonal). PIR= rio Piraquara; CAE= rio Caerana; PEQ= rio Pequeno; VAR= rio da Várzea; AGU= rio Água Verde; MER= rio Mergulhão; RIB= rio Ribeirão; MON= rio Mongaguá; ITA= rio Caixa d'Água; ACA= rio Acarai.

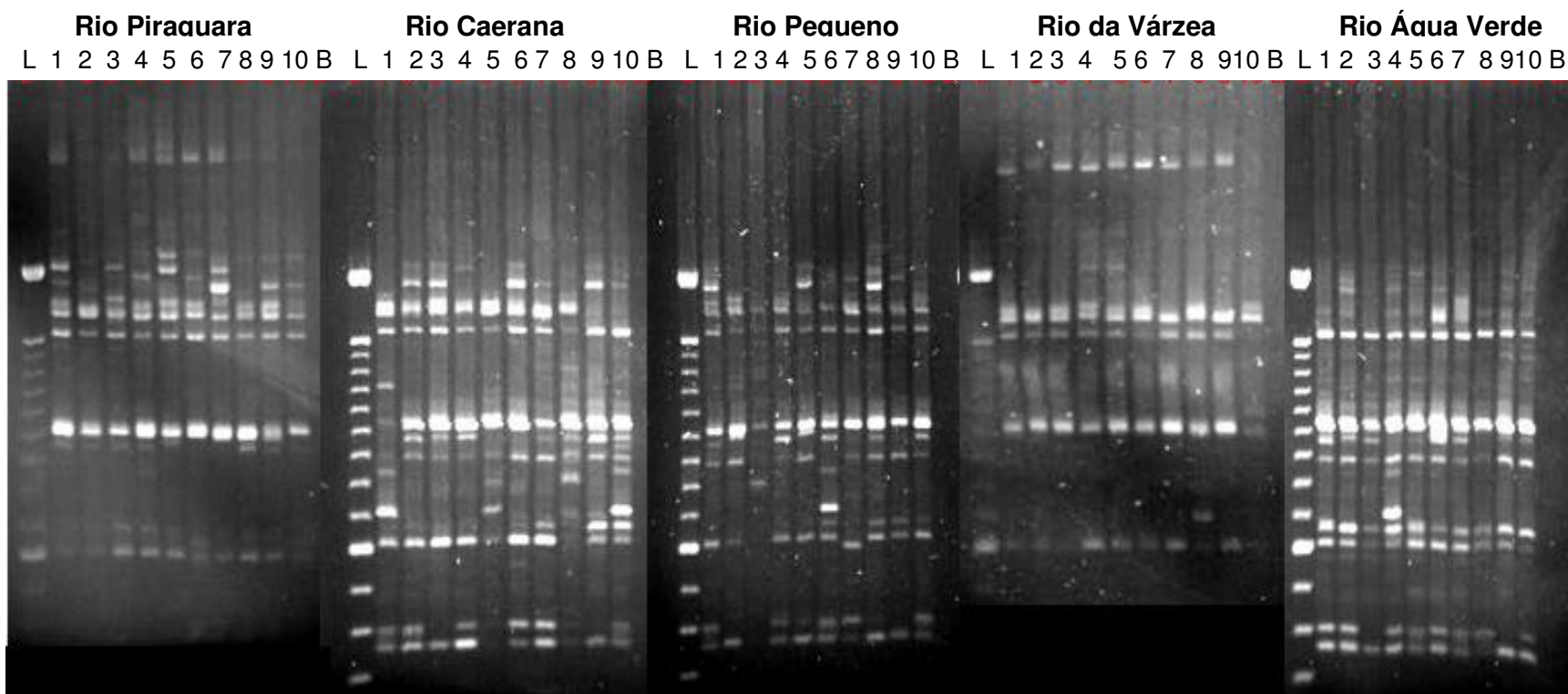
	PIR	CAE	PEQ	VAR	AGU	MER	RIB	MON	ITA	ACA
PIR	-	0,284	0,264	0,261	0,224	0,349	0,431	0,448	0,435	0,381
CAE	2,2	-	0,273	0,275	0,261	0,338	0,441	0,420	0,422	0,363
PEQ	13,2	11	-	0,254	0,228	0,364	0,419	0,451	0,450	0,387
VAR	71,5	69,3	62,7	-	0,255	0,271	0,349	0,390	0,393	0,355
AGU	128,7	126,5	121	60,5	-	0,333	0,401	0,461	0,439	0,392
MER	24,2	24,2	37,4	88	146,3	-	0,243	0,316	0,292	0,313
RIB	38,5	38,5	35,2	93,5	154	16,5	-	0,361	0,338	0,413
MON	236,5	238,7	242	304,7	357,5	161,7	214,5	-	0,221	0,352
ITA	189,2	191,4	198	255,2	314,6	170,5	170,5	49,5	-	0,373
ACA	82,5	80,3	71,5	99	148,5	71,5	60,5	253	212,3	-



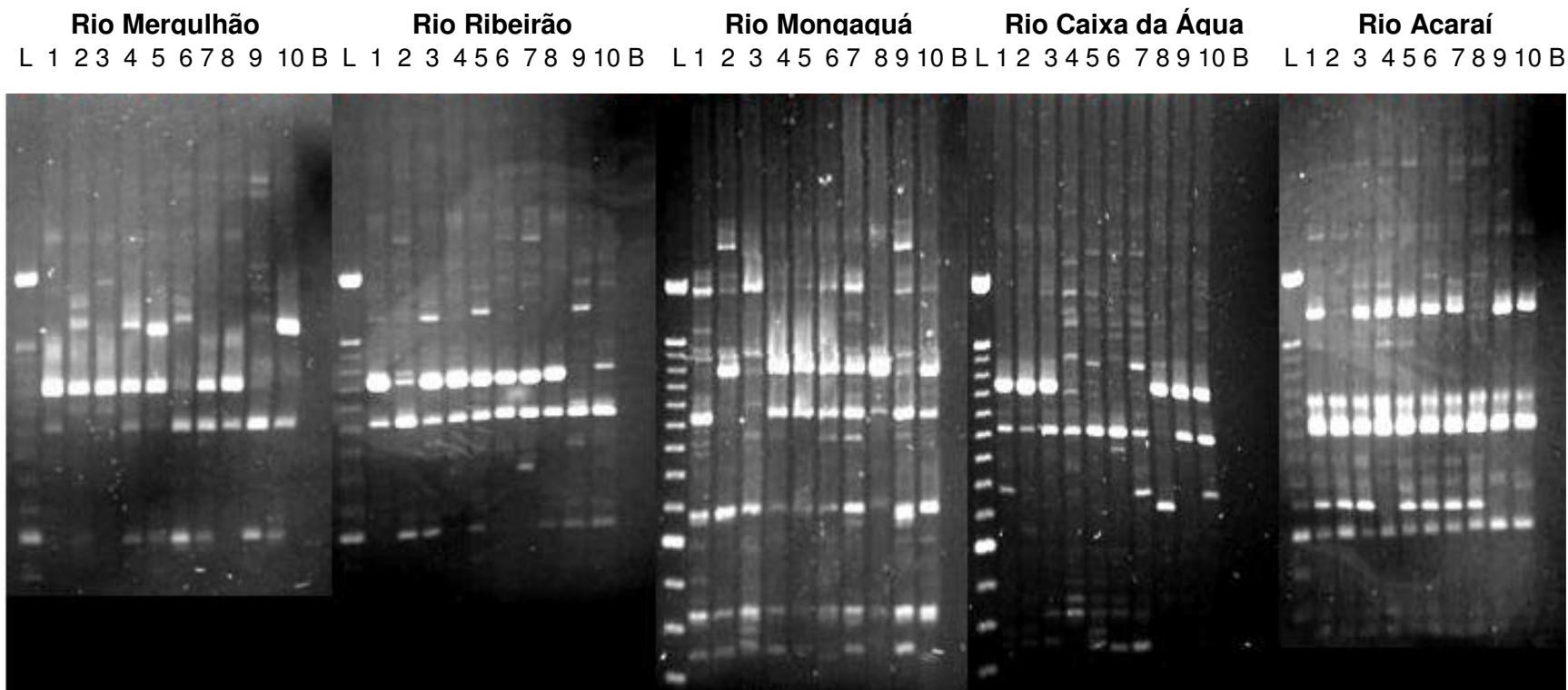
**Figura 3a.** Eletroforese em gel de agarose 1,4% (*primer* OPA2), como forma de representação dos perfis RAPD obtidos para as amostras pertencentes ao Primeiro Planalto Paranaense (ver Tabela 1 para detalhes). L= *Ladder* (marcador de peso molecular de 100pb), B= controle negativo. Os numerais de 1 a 10 representam os dez espécimes de *Mimagoniates microlepis* amostrados nos rios descritos acima.



**Figura 3b.** Eletroforese em gel de agarose 1,4% (*primer* OPA2), como forma de representação dos perfis RAPD obtidos para as amostras pertencentes a Planície Costeira (ver Tabela 1 para detalhes). L= *Ladder* (marcador de peso molecular de 100pb), B= controle negativo. Os numerais de 1 a 10 representam os dez espécimes de *Mimagoniates microlepis* amostrados nos rios descritos acima.



**Figura 4a.** Eletroforese em gel de agarose 1,4% (*primer* OPW5), como forma de representação dos perfis RAPD obtidos para as amostras pertencentes ao Primeiro Planalto Paranaense (ver Tabela 1 para detalhes). L= *Ladder* (marcador de peso molecular de 100pb), B= controle negativo. Os numerais de 1 a 10 representam os dez espécimes de *Mimagoniates microlepis* amostrados nos rios descritos acima.

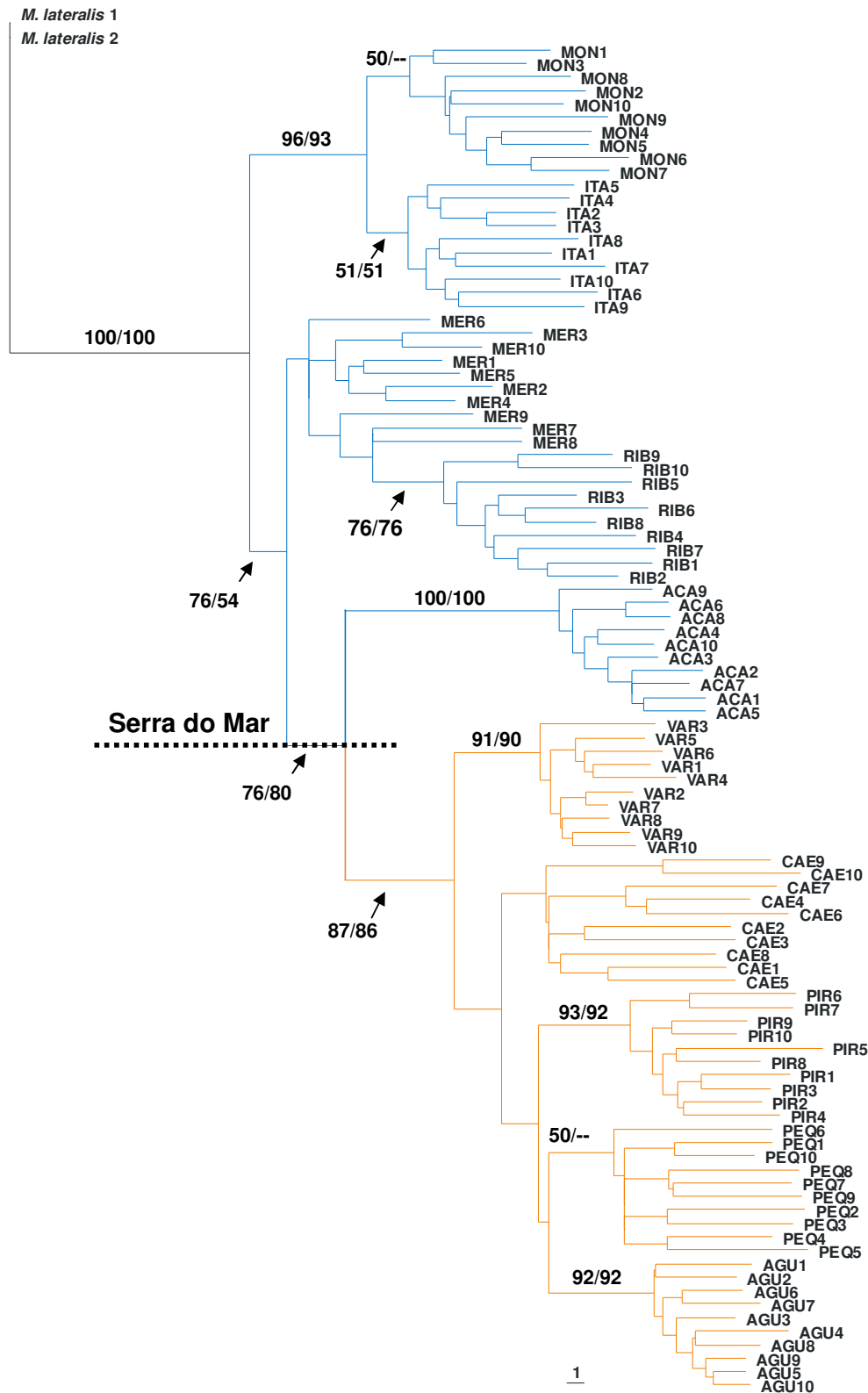


**Figura 4b.** Eletroforese em gel de agarose 1,4% (*primer* OPW5), como forma de representação dos perfis RAPD obtidos para as amostras pertencentes a Planície Costeira (ver Tabela 1 para detalhes). L= *Ladder* (marcador de peso molecular de 100pb), B= controle negativo. Os numerais de 1 a 10 representam os dez espécimes de *Mimagoniates microlepis* amostrados nos rios descritos acima.

### 3.2 Análise das relações genéticas e evolutivas

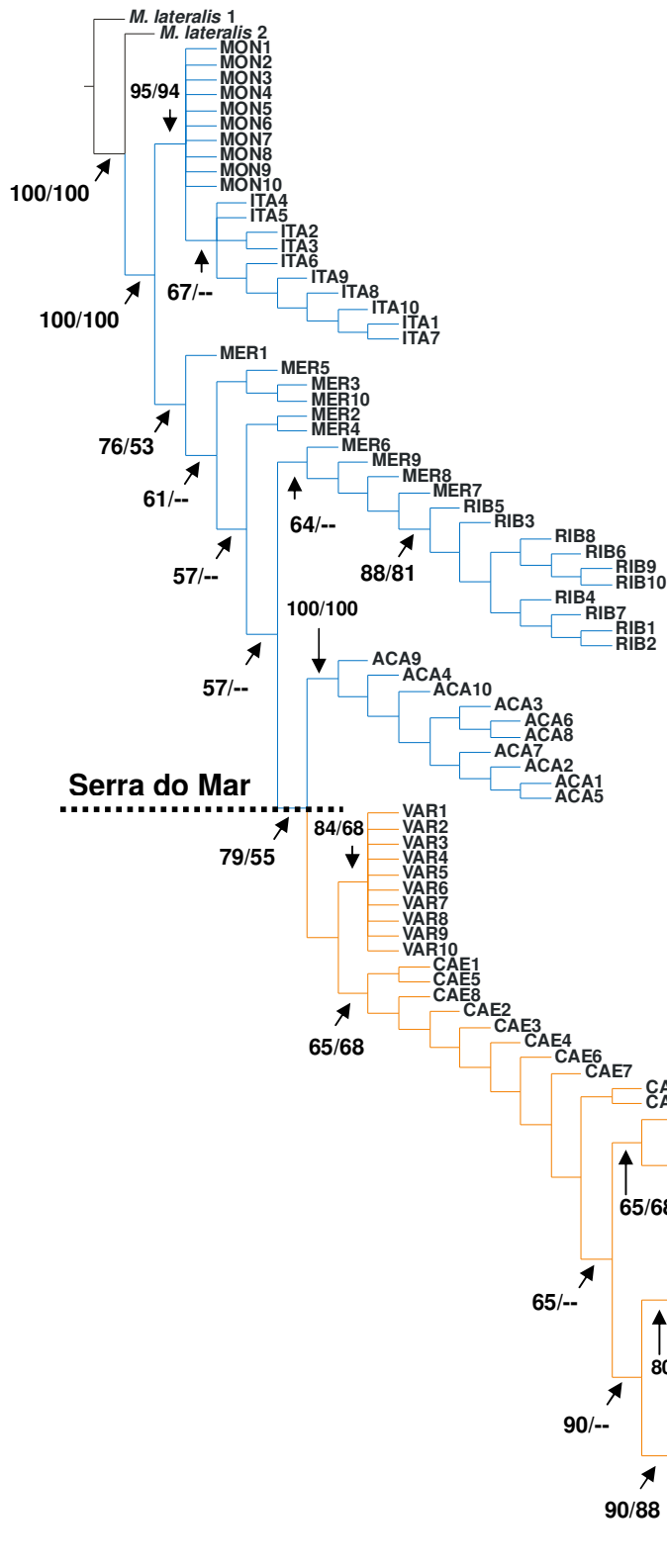
Considerando os dois métodos utilizados (Distância e Parcimônia), foi observada a ocorrência de dois estoques genéticos bem definidos para *M. microlepis* (Figuras 5 e 6). Muito embora possam ser observadas algumas sutis incongruências entre os agrupamentos gerados, os referidos estoques compreendem as amostras oriundas do Primeiro Planalto Paranaense (Alto Iguaçu), isoladamente daquele composto pelas amostras de *M. microlepis* da Planície Costeira (região costeira sul do estado de São Paulo e litorais dos estados do Paraná e Santa Catarina) (Figuras 5 e 6). Além disso e, apesar de serem observadas partições da variação genética nas amostras dos rios Caerana (Figura 6) e Mergulhão (Figuras 5 e 6), a análise pormenorizada dos agrupamentos ainda sugere padrões de estruturação genética localmente bem definidos e uma forte tendência de diversificação evolutiva para *M. microlepis* (Figuras 5 e 6).

Em relação ao agrupamento por Neighbor-Joining (Figura 5), observou-se no Alto Iguaçu um maior relacionamento genético entre as amostras de *M. microlepis* oriundas dos rios Água Verde e Pequeno. Tal unidade genética mostrou-se ainda mais relacionada geneticamente com os exemplares do rio Piraquara. Os exemplares do rio da Várzea constituíram-se na amostra geneticamente mais distantes das demais (Figura 5). Assim, podem ser observadas 5 unidades genéticas distintas para *M. microlepis*, cada uma delas correspondente a uma localidade amostrada. Todavia, na Planície Costeira, detectou-se uma maior proximidade genética entre as amostras de *M. microlepis* oriundas dos rios Mongaguá e Caixa d'Água (região costeira do estado de São Paulo) e entre os rios Mergulhão e Ribeirão (litoral do Paraná). Já este último grupo caracterizou-se como mais geneticamente correlacionado com a unidade genética composta pela amostra do rio Acarai e todas aquelas nativas da região do Alto Iguaçu. Assim, a amostra do litoral de Santa Catarina (rio Acarai) constituiu-se em um terceiro estoque litorâneo (Figuras 5).



**Figura 5.** Relações de distância genética entre as amostras de *Mimagoniates microlepis* obtida pela análise de Neighbor-joining (NJ) com *M. lateralis* como grupo externo. As diferentes cores indicam os dois grupos genéticos identificados (Azul= Planície Costeira; Alaranjado= Alto Iguaçu). A linha pontilhada indica a Serra do Mar como o divisor dos grupamentos genéticos. Os valores de Bootstrap/Jackknife encontram-se indicados nos ramos.





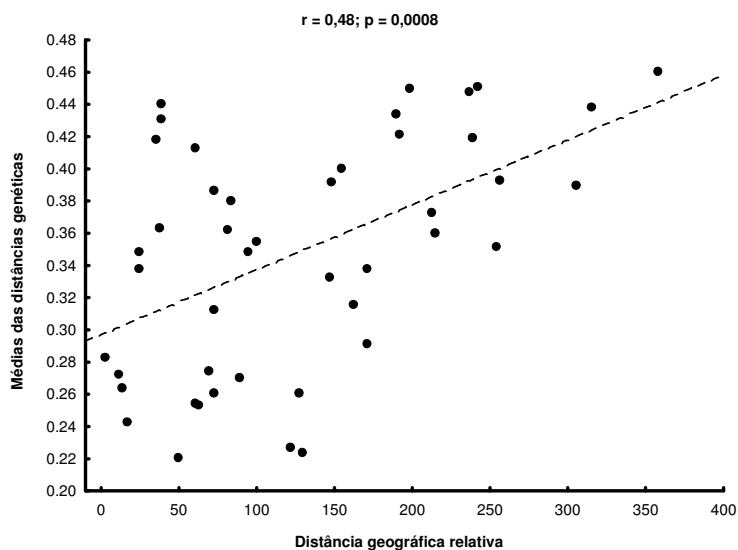
**Figura 6.** Relações filogenéticas entre as amostras de *Mimagoniates microlepis* obtida pela análise de parcimônia com *M. lateralis* como grupo externo. As diferentes cores indicam os dois grupos evolutivos identificados (Azul= Planície Costeira; Alaranjado= Alto Iguaçu). A linha pontilhada indica a Serra do Mar como o divisor dos grupamentos genéticos. Os valores de Bootstrap/Jackknife encontram-se indicados nos ramos.

A análise de Parcimônia gerou 1248 árvores igualmente parcimoniosas ( $L=894$ ;  $Ci=12$ ;  $Ri=69$ ). O consenso estrito gerado caracterizou-se por apresentar 989 passos, com índice de consistência ( $Ci$ ) igual a 10 e índice de retenção ( $Ri$ ) igual a 66. Foi observada ainda de forma geral (Figura 6) a ocorrência de duas unidades evolutivas bem definidas (Alto Iguaçu e Planície Costeira), com exceção da amostra do rio Acarai que se apresentou como grupo irmão das amostras de *M. microlepis* do Alto Iguaçu. A amostra do rio Várzea se caracterizou, em termos evolutivos, como a mais basal entre todas as amostras estudadas. Além disso, a exceção da amostra de *M. microlepis* do rio Caerana, pôde ser observada a ocorrência de 4 grupos monofiléticos ocorrendo nos rios Água Verde, Pequeno, Piraquara e Várzea na região do Alto Iguaçu. Os exemplares de *M. microlepis* que constituíram a amostra do rio da Várzea apresentaram-se como o grupo-irmão de todas as demais amostras. Na Planície Costeira, à exceção da amostra do rio Mergulhão, pôde ser observada a ocorrência de 4 unidades monofiléticas ocorrendo nos rios Acarai, Ribeirão, Caixa d'Água e Mongaguá. Além disso, as amostras dos rios Caixa d'Água e Mongaguá apresentaram-se, evolutivamente, como grupos irmãos. Este grupamento evolutivo se mostrou como grupo mais basal em relação às demais amostras da Planície Costeira (Figura 6).

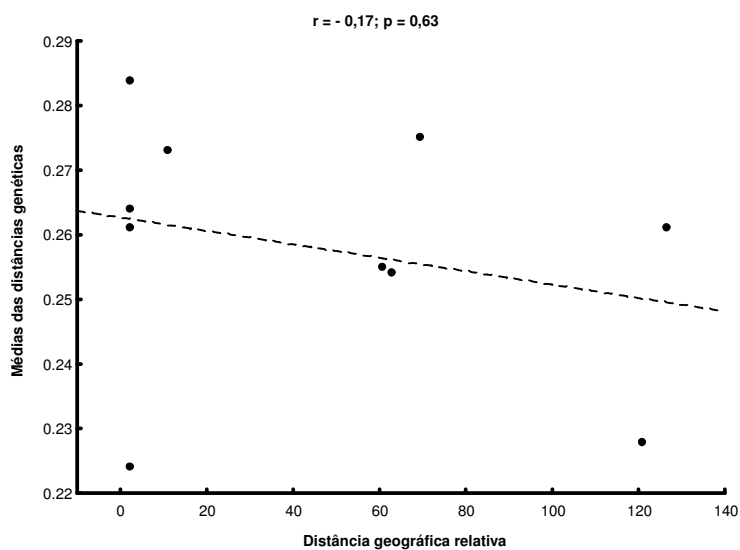
Uma análise mais geral, porém não menos acurada, revelou ainda a existência de três grupos relativamente bem definidos na Planície Costeira: litoral de São Paulo, parte litoral paranaense (rio Ribeirão) e litoral catarinense (Figura 6).

A Figura 7 apresenta o gráfico que expressa a correlação (Spearman) entre as médias das distâncias genéticas e das distâncias geográficas relativas entre todas as amostras estudadas de *M. microlepis*, demonstrando a existência de uma correlação positiva entre as variáveis ( $r=0,48$ ;  $p=0,0008$ ). Na Figura 8 é apresentado o gráfico que expressa a mesma correlação (Spearman), porém apenas entre as amostras do Alto Iguaçu, demonstrando que a correlação apresentada não tem significância estatística ( $r=-0,17$ ,  $p=0,63$ ). Na Figura 9 é apresentado o gráfico que expressa a mesma correlação (Spearman), porém apenas entre todas as amostras da Planície Costeira na região Sudeste/Sul, demonstrando que a correlação apresentada não tem significância estatística ( $r=0,54$ ,  $p=0,1$ ). Já a figura 10 apresenta o gráfico que expressa a correlação (Spearman) das médias das distâncias genéticas e das distâncias geográficas relativas entre as amostras do Alto

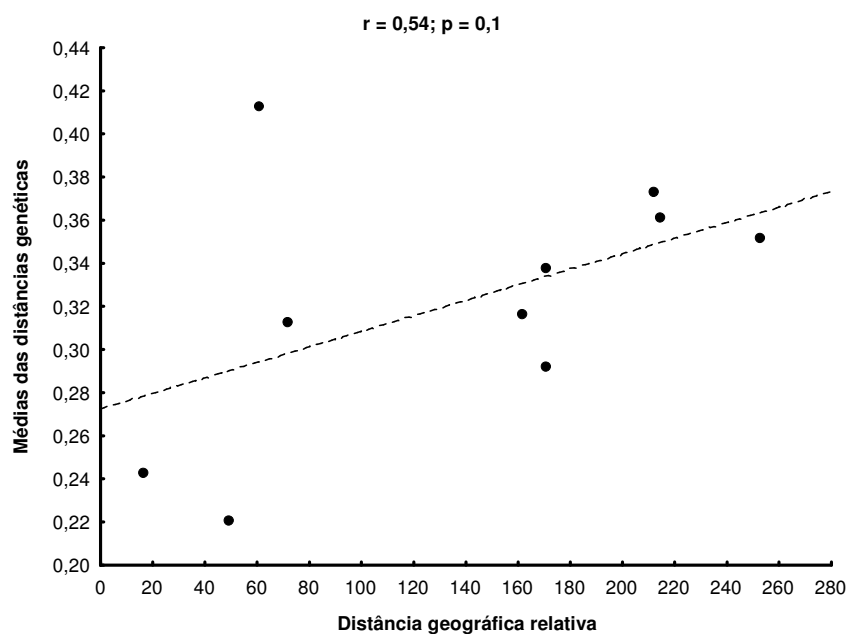
Iguaçu, em relação às da Planície Costeira na região Sudeste/Sul, demonstrando uma correlação positiva entre as variáveis ( $r = 0,54$ ,  $p = 0,004$ ).



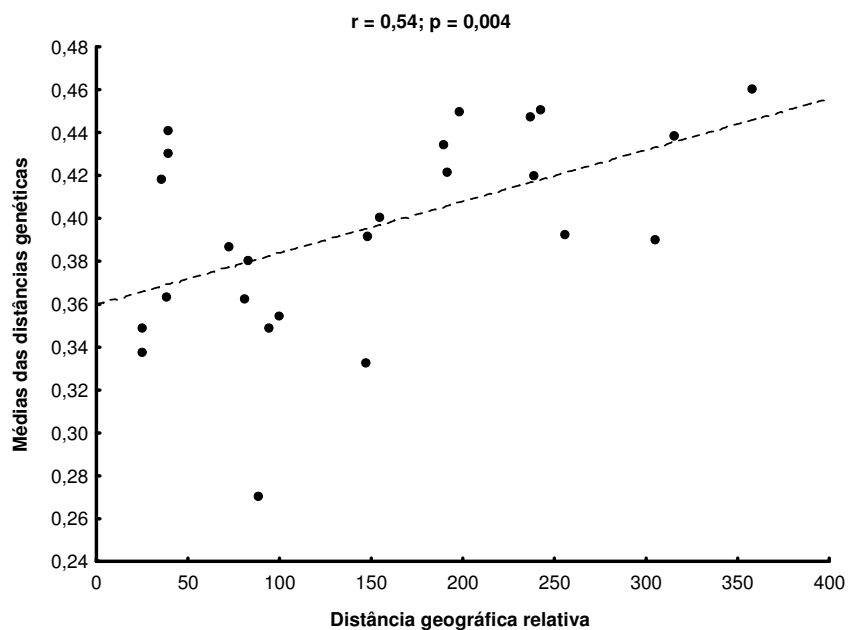
**Figura 7.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as médias das distâncias genéticas e as distâncias geográficas relativas (km) entre todas as amostras de *M. microlepis* estudadas.



**Figura 8.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as médias das distâncias genéticas e as distâncias geográficas relativas (km) entre as amostras de *M. microlepis* estudadas da região do Alto Iguaçu.



**Figura 9.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as médias das distâncias genéticas e a distâncias geográficas relativas (km) entre as amostras de *M. microlepis* estudadas da região da Planície Costeira.



**Figura 10.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as médias das distâncias genéticas e a distâncias geográficas relativas (km) entre as amostras de *M. microlepis* estudadas do Alto Iguaçu em relação àquelas da Planície Costeira.

### 3.3. AMOVA e parâmetros populacionais

Na Tabela 8 são descritos os resultados obtidos da Análise de Variância Molecular (AMOVA). Esta análise evidenciou que 61,32% da diversidade genética total identificada encontra-se entre as amostras estudadas de *M. microlepis* e, portanto, cerca de 38,7% desta diversidade está dentro das amostras. Além destes resultados, observou-se pela AMOVA, o  $\Phi_{ST}$  da ordem de 0,59766. A implementação do o Teste Exato de Fisher demonstrou que a AMOVA apresenta significância estatística (Tabela 8;  $p= 0,00039$ ).

A análise estatística de Wright (1978), (PopGene v.1.3.2; Yeah *et al.*, 1999) revelou um  $N_m$  global igual a 0,3235 e o  $G_{ST}$  global igual a 0,6071. Além destes resultados, foram determinados os valores de  $N_m$  e  $G_{ST}$  entre as amostras de *M. microlepis* do Alto Iguaçu ( $N_m= 0,5804$  e  $G_{ST} = 0,4828$ ) e entre as da Planície Costeira ( $N_m= 0,5544$  e  $G_{ST}= 0,4019$ ). Os valores de  $N_m$  e  $G_{ST}$  pareados, considerando todas as amostras estudadas, são apresentados na Tabela 9. Tais valores variaram desde 0,287 [rios Acarai (litoral catarinense) e Água Verde (planalto catarinense)] até 1,557 [rios Mongaguá e Caixa d'Água (litoral de São Paulo)] para  $N_m$  e desde 0,243 [rios Mongaguá e Caixa d'Água (litoral de São Paulo)] até 0,635 [rios Acarai (litoral catarinense) e Água Verde (planalto catarinense)] para  $G_{ST}$ . Na Tabela 10 são apresentados os resultados relativos às análises de correlação (Spearman) entre as distâncias geográficas relativas e os valores de  $N_m$  e  $G_{ST}$  para as amostras do Alto Iguaçu, Planície Costeira e aquelas do Alto Iguaçu em relação às da Planície Costeira.

Nas Figuras 11 e 12 são apresentados os gráficos que expressam as correlações (Spearman) entre as distâncias geográficas relativas de todas as amostras de *M. microlepis* estudadas, em relação, respectivamente, ao  $N_m$  e ao  $G_{ST}$ . A Figura 11 mostra a existência de uma correlação negativa entre as variáveis e na Figura 12 é observada um correlação positiva entre as variáveis.

**Tabela 8.** Resultados obtidos segundo a análise de AMOVA envolvendo todas as amostras estudadas de *M. microlepis*. Gl= graus de liberdade; Sq= soma dos quadrados; Qm= quadrado médio; F= teste exato de Fisher; CV= Componentes da variância; p= significância estatística.

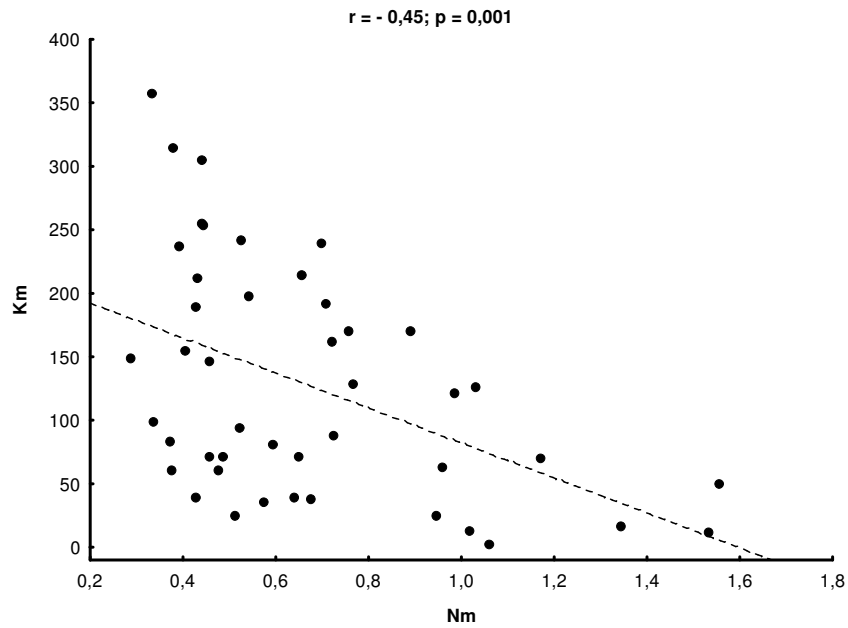
Fonte da variação	Gl	Sq	Qm	F	CV	% variação (Phi <sub>ST</sub> )	p
Entre amostras	9	1111,870	123,541		11.5748888889	59,7	
Dentro das amostras	90	701,300	7,792		7.79222222222	40,3	
Total	99	1813,170		15,885			0,00039

**Tabela 9.** Valores de  $G_{ST}$  (acima do diagonal) e  $Nm$  (abaixo da diagonal) obtidos entre as amostras estudadas de *M. microlepis*. PIR= rio Piraquara; CAE= rio Caerana; PEQ= rio Pequeno; VAR= rio da Várzea; AGU= rio Água Verde; MER= rio Mergulhão; RIB= rio Ribeirão; MON= rio Mongaguá; ITA= rio Caixa d'Água; ACA= rio Acarai.

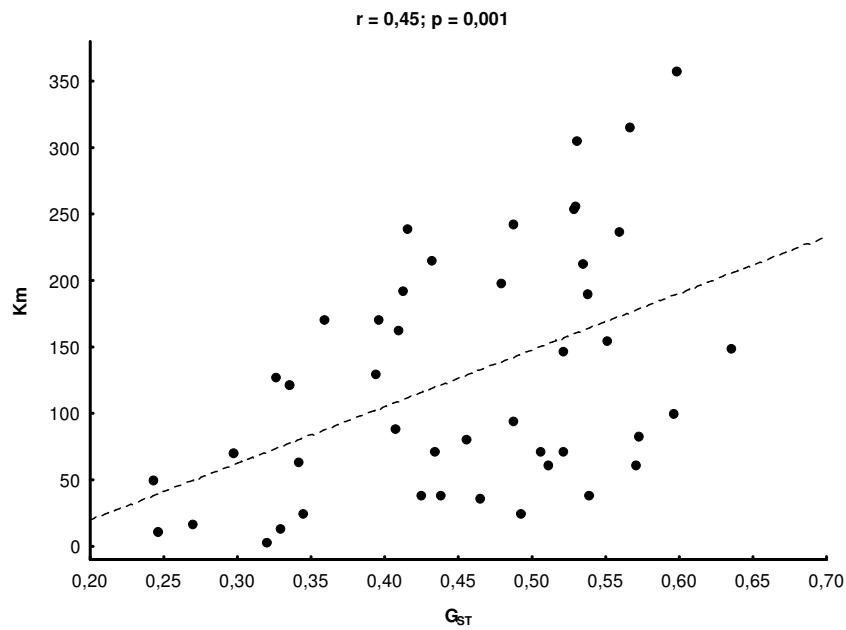
	PIR	CAE	PEQ	VAR	AGU	MER	RIB	MON	ITA	ACA
<b>PIR</b>	-	0,320	0,329	0,434	0,394	0,493	0,539	0,559	0,538	0,573
<b>CAE</b>	1,062	-	0,246	0,298	0,326	0,345	0,438	0,416	0,413	0,456
<b>PEQ</b>	1,018	1,532	-	0,342	0,336	0,425	0,465	0,487	0,479	0,521
<b>VAR</b>	0,649	1,172	0,961	-	0,511	0,407	0,488	0,531	0,530	0,596
<b>AGU</b>	0,766	1,032	0,984	0,477	-	0,521	0,551	0,598	0,567	0,635
<b>MER</b>	0,514	0,946	0,675	0,725	0,459	-	0,270	0,409	0,359	0,506
<b>RIB</b>	0,427	0,639	0,575	0,523	0,406	1,345	-	0,432	0,396	0,571
<b>MON</b>	0,393	0,699	0,526	0,440	0,335	0,720	0,656	-	0,243	0,529
<b>ITA</b>	0,429	0,708	0,543	0,442	0,380	0,891	0,759	1,557	-	0,535
<b>ACA</b>	0,372	0,596	0,459	0,337	0,287	0,488	0,375	0,444	0,433	-

**Tabela 10.** Resultado das análises de Correlação de Spearman entre distância geográfica (Km) e número de migrantes ( $Nm$ ) e entre distância geográfica relativa (km) e diversidade genética interpopulacional ( $G_{ST}$ ), mediante as amostras de *M. microlepis* das regiões do Alto Iguaçu, as amostras da Planície Costeira e entre ambas as regiões. N= número de correlações; r= índice de correlação; p= significância. \* Intervalo de confiança de 95%.

Regiões	Correlação	N	r	p
Alto Iguaçu	Km x $Nm$	10	-0,38	0,27
	Km x $G_{ST}$	10	0,38	0,27
Planície Costeira	Km x $Nm$	10	-0,43	0,20
	Km x $G_{ST}$	10	0,43	0,20
Alto Iguaçu x Planície Costeira	Km x $Nm$	25	-0,38	0,05*
	Km x $G_{ST}$	25	0,38	0,05*



**Figura 11.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as distâncias geográficas relativas (km) e os valores de  $N_m$  pareados, mediante todas as amostras de *M. microlepis* estudadas.



**Figura 12.** Gráfico da análise de correlação de Spearman entre as distâncias geográficas relativas (km) e os valores de  $G_{ST}$  pareados, mediante todas as amostras de *M. microlepis* estudadas.



## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Dados de RAPD, diversidade genética e biológica em *M. microlepis*

O acesso à diversidade genética via marcadores moleculares de DNA, associados a sofisticadas ferramentas analíticas, têm contribuído significativamente para entendimento dos processos históricos (bióticos e abióticos) que modulam a diversificação intraespecífica da biota, especificamente a diversidade populacional (Templeton 1998; Avise 1994, 2000; Posada & Crandall 2001; Brant & Ortí 2003; Ali *et al.*, 2004).

Nesse sentido, os marcadores RAPD vêm se constituindo numa importante ferramenta de acesso à diversidade genética, pois permite a ecólogos e biólogos evolutivos determinar a arquitetura geral do genoma, em termos de sua diversidade genética e, verificar como esta interage em uma ampla variedade de indivíduos relacionados proximamente (Ali *et al.*, 2004). Segundo Bardacki (2001), os marcadores RAPD se constituem como uma alternativa metodológica simples, barata e que permite uma análise acurada acerca das relações genéticas e evolutivas entre populações de espécies. Os dados obtidos no presente estudo corroboram as propostas acima descritas, uma vez que reiteram o potencial dos marcadores RAPD para a análise de diversidade intraespecífica, tendo em vista a diversidade genética observada e a sua associação com a ocorrência de diversidade biológica entre as amostras de *M. microlepis* [Figuras 3a-b e 4a-b ; Figuras 5 e 6; Tabelas 5, 6 e 9 (acima da diagonal); Anexo I e II].

Uma interessante questão, no que se refere a uma consistente estimativa da diversidade genética da biota, é o número de *primers* a serem utilizados na análise. Porém, o número de locos obtido parece se constituir como um critério mais importante do que propriamente o número de *primers* utilizado (Telles *et al.*, 2001; Hollingsworth & Ennos, 2004).

Segundo Telles *et al.* (2001), são necessários no mínimo 60 loci para uma estimativa consistente da variação genética, uma vez que a partir desta quantidade são observadas reduções significativas nos desvios-padrão e, conseqüentemente, nos coeficientes-de-variação. Estes autores ainda destacam nos seus experimentos que tal quantidade de loci foi alcançada mediante o uso de seis *primers*. De acordo com Hollingsworth & Ennos (2004), o uso de no mínimo 50 loci para marcadores

RAPD revela alta consistência no que se refere a recuperação de topologias não resolvidas, apresentando altos índices de diferenciação populacional (por exemplo,  $F_{ST} \geq 0,15$ ). Todavia, parece lógico imaginar que, quanto maior for a quantidade de *primers* usados e, que gerem um número igual ou maior a 60 loci, a consistência dos dados tende a ser cada vez maior. Nesse sentido, o estudo que aqui se apresenta parece se adequar à orientação proposta por Telles *et al.* (2001) e Hollingsworth & Ennos (2004), tendo em vista a obtenção de 111 loci (marcadores) mediante o uso dos seis *primers* utilizados (Tabela 2 e Anexo II). Resultados similares foram obtidos por Almeida *et al.* (2001) que objetivaram analisar a variação genética dentro e entre populações de *Pimelodus cf. absconditus* (Siluriformes: Pimelodidae). Nesse estudo foram obtidos 140 loci (marcadores), mediante o uso de sete *primers*. Além desta análise, o estudo de filogeografia comparativa em populações de *Xiphophorus variatus* e *Heterandria jonesi* (Cyprinodontiformes) corrobora a consistência do uso de seis *primers*, tendo em vista a obtenção de 256 loci para *X. variatus* e 210 loci para *H. jonesi*, mediante o uso de seis *primers* (Chen & Borowsky, 2004). García *et al.*, (2004), em estudo de três espécies de *Cynolebias*, também obtiveram análises robustas, por meio do uso de 6 *primers* que geraram 61 loci polimórficos.

Outro aspecto acerca do uso de marcadores RAPD é o patamar de variabilidade ou diversidade genética acessada. Os termos variabilidade ou diversidade genética representam o mais importante componente biológico da evolução, disponibilizando a matéria prima para a diversidade e adaptação (Amos & Harwood 1998).

Dentre as formas de mensuração da diversidade genética, estão a estimativa do número de loci polimórficos em relação ao número total de loci analisados e, a estimativa do número de loci polimórficos de cada amostra em relação ao número total de loci analisados. Uma terceira forma de mensuração se caracteriza pela estimativa do número de loci variantes de cada amostra em relação ao número total de loci em cada amostra. Tais estimativas sugerem respectivamente, o quanto de diversidade genética global existe na espécie na área estudada, com o quanto de variabilidade cada amostra local contribui para o total de diversidade acessada e o quanto de diversidade genética existe em cada amostra local, mediante o total de variabilidade acessada para cada amostra. Conforme já mencionado, *M. microlepis* apresenta 95,4% de diversidade genética global nas regiões estudadas, que

compreenderam o Alto Iguaçu e a Planície Costeira Sudeste/Sul do Brasil. Tais resultados são muito similares àqueles observados por Prioli *et al.* (2002) que identificaram 90% de diversidade genética em *Astyanax altiparanae* do rio Iguaçu. Em amostras de *Astyanax scabripinnis*, oriundas de riachos urbanos de Londrina (PR) foi identificada uma diversidade da ordem de 81,3% (Sofia *et al.*, 2006). Por outro lado, *Pseudoplatystoma corruscans* do rio Paraná apresentou 27% de diversidade global e *B. lundii*, no rio São Francisco, apresentou 34,7% de variação genética (Sekine *et al.*, 2002; Wasko *et al.*, 2002). Portanto, as comparações entre todas estas estimativas indicam que *M. microlepis* apresenta uma alta diversidade genética, sugerindo duas hipóteses: (1) que a espécie encontra-se num excelente estado de conservação, tendo em vista o conjunto de dados e a área estudada e, (2) que boa parte de toda diversidade genética observada seja oriunda de patrimônios genéticos de espécies diferentes.

Na tabela 5 é observada a representatividade percentual da diversidade genética de cada amostra de *M. microlepis* em relação ao conjunto de loci analisados. Portanto, os dados ali demonstrados apontam para a amostra do rio Caerana (Piraquara, PR) como aquela que contribui mais expressivamente com o total da diversidade observada (45,04%). Já, as amostras pertencentes aos rios Acarai (São Francisco do Sul, SC), Água Verde (Canoinhas, SC) e Várzea (Lapa, PR), caracterizam-se como aquelas que contribuem respectivamente menos com a diversidade genética total observada (21,62%, 21,62% e 20,72%; Tabela 5). Estes dados percentuais de diversidade genética indicam *M. microlepis* do rio Caerana como a população local potencialmente mais plástica em termos adaptativos, mesmo que toda a sua diversidade seja consequência de deriva genética ou seleção estabilizadora, na dependência desta ser uma amostra de uma população finita ou infinita. Por outro lado, *M. microlepis* dos rios Acarai, Água Verde e Várzea constituem-se potencialmente menos plásticos em termos adaptativos, uma vez que apresentam um patamar de diversidade muito menor, quando comparados aos *M. microlepis* do rio Caerana.

Na tabela 6 são observados os níveis de diversidade genética própria de cada amostra. Assim, observa-se que a amostra de *M. microlepis* do rio Mergulhão (Antonina, PR; Figura 2) apresenta a maior diversidade intrapopulacional (80,39%). Neste caso, tal diversidade parece ser consequência de deriva genética, tendo em vista que o rio Mergulhão é um sistema hídrico isolado na Planície Costeira

paranaense e certamente deve ter sofrido profunda influência da última incursão marinha ocorrida entre 6.500 e 7000 anos (Suguio *et al.*, 2005). Por outro lado, a amostra do rio Acaraí (São Francisco do Sul, SC; Figura 2) caracteriza-se por apresentar a menor taxa de diversidade genética intrapopulacional (44,44%). Essas evidências sugerem o estado de conservação de *M. microlepis* nestas localidades e apontam para o fato de que as amostras litorâneas parecem reter mais diversidade genética do que aquelas do Alto Iguaçu, com exceção do rio Acaraí na Planície Costeira e rio Caerana (78,1%) no Alto Iguaçu. Tal consideração sugere que as amostras de *M. microlepis* do Alto Iguaçu mereçam maiores prioridades de conservação do que quaisquer outras na região estudada. Especialmente para a amostra oriunda do sistema do rio Acaraí, o seu patamar de diversidade genética, quando comparado aos demais de sua região, sugere uma condição de recente divergência de um estoque litorâneo continental maior, que tenha se isolado a partir do avanço do nível do mar, seguindo a idéia do Princípio do Fundador, conforme Mayr (1977).

## **4.2 Estruturação genético-evolutiva em *M. microlepis***

### **4.2.1 Alto Iguaçu**

Uma população mendeliana caracteriza-se como uma comunidade de indivíduos intercruzantes a qual compartilha variantes genéticas dentro de uma área geográfica. Neste conceito de população genética encontra-se inserida a condição de panmixia, a qual define iguais probabilidades de trocas gênicas entre indivíduos próximos ou distantes geograficamente (Dobzhansky, 1950).

Um interessante aspecto acerca dos fatores que governam a distribuição da variação genética, é a distribuição espacial das unidades reprodutivas (Avise 2000). Observa-se, com alguma frequência, entre as espécies de peixes, uma subdivisão em populações locais isoladas (Carvalho, 1993). Este fenômeno apresenta-se mais acentuadamente em peixes de água doce, uma vez que rios ou lagos são potencialmente isolados uns dos outros por barreiras geográficas. Portanto, fatores históricos tais como dispersão e/ou vicariância, podem influenciar na distribuição destas unidades reprodutivas, bem como nas suas identidades genéticas (Amos &

Harwood, 1998; Avise 2000).

Na presente análise, foram estudadas amostras de *M. microlepis* de cinco riachos componentes do sistema do Alto Iguaçu, bem como outros cinco localizados sobre a Planície Costeira Sudeste/Sul, nas regiões litorâneas dos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Tabela 1, Figuras 2). Apesar das amostras de *M. microlepis* dos rios Caerana (Alto Iguaçu; Figura 6) e Mergulhão (Planície Costeira paranaense; Figura 5 e 6) apresentarem uma sutil menor estruturação do que as demais amostras (Figuras 5 e 6), as relações genéticas apresentadas sugerem que *M. microlepis* parece tender à estruturação. Tal consideração se baseia na ocorrência de nove unidades genéticas pela análise de Neighbor-Joining (Figuras 5). Já pela análise de parcimônia (Figura 6), são identificadas oito unidades monofiléticas.

A idéia acerca de uma tendência à estruturação genética associada à diversidade evolutiva em *M. microlepis*, parece ter suporte adicional mediante as comparações “par a par” do  $G_{ST}$  apresentados na Tabela 9, o cálculo do  $G_{ST}$  global, o cálculo de  $\Phi_{ST}$  global, além dos  $Nm$  pareados (Tabela 9) e  $Nm$  global. As comparações do  $G_{ST}$  pareados apresentam em 95,6% das comparações índices de diferenciação interpopulacional acima de 0,27 (Tabela 9). Valores de  $G_{ST}$  acima de 0,25 apontam para uma estruturação evolutiva bem acentuada (Wright 1978). Mediante o cálculo de  $G_{ST}$  global foi identificada a ocorrência de uma diferenciação interpopulacional da ordem de 0,6071. Segundo a AMOVA, ainda foi observado um  $\Phi_{ST}$  global da ordem de 0,5976 (Tabela 8). Valores de  $\Phi_{ST}$  superiores a 0,25 indicam uma diferenciação genética muito acentuada (Hartl & Clark, 1997). Adicionalmente, a Tabela 9 ainda apresenta a estimativa de fluxo gênico, mediante o parâmetro  $Nm$ . Dessa forma, são apresentadas 45 comparações “par a par” e, em 84,5% das comparações são observados um baixo número de migrantes por geração. Valores de  $Nm < 1$  apontam para uma ação em favor de uma diferenciação genética (conforme Almeida *et al.*, 2003). Mediante o cálculo de  $Nm$  global foi identificada a ocorrência de um fluxo gênico da ordem de 0,3235 indivíduos por geração.

Como forma alternativa de sustentar a idéia acima mencionada, acerca da ampla diversidade entre a maioria das amostras estudadas de *M. microlepis*, a Figura 7 mostra que existe correlação ( $r = 0,48$ .  $p = 0,0008$ ) entre as médias das distâncias genéticas e as distâncias geográficas relativas (Tabela 7). Tal correlação

sugere que a diversidade entre os *M. microlepis* estudados parece também ser influenciada pela distância, minimizando a possibilidade de trocas gênicas entre exemplares oriundos das localidades estudadas, favorecendo a sua diferenciação genética e evolutiva. Diversos autores têm revelado a ocorrência de estruturação na fauna de peixes neotropicais por meio da análise da diversidade genética (Dergam *et al.*, 1998; 2002; Wasko & Galetti, 2002; Hatanaka & Galetti-Jr., 2003; Almeida *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2003; Beheregaray *et al.*, 2001; Leuzzi *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004).

O Alto Iguaçu configura-se como uma área biogeográfica natural, tendo em vista que observações geomorfológicas e paleoclimáticas indicam que a sua ictiofauna passou por processos únicos, que levaram ao seu aparecimento e riqueza. Como exemplo, está a hipótese de relações pretéritas entre as suas cabeceiras e alguns riachos litorâneos [Abilhoa & Boscardim (2004); Abilhoa (2005)].

As amostras de *M. microlepis* oriundas do Alto Iguaçu apresentaram significativa estruturação (Figura 5;  $Nm= 0,5804$ ;  $G_{ST}= 0,48828$ ), podendo até terem alcançado o *status* de metapopulações (Baguette, 2004). Suportes adicionais para tal hipótese apresentam-se demonstrados na Figura 8 e Tabela 10. A correlação (Spearman) apresentada na Figura 8 não tem nenhuma sustentação estatística ( $r= -0,17$ ;  $p= 0,63$ ), sugerindo que as distâncias geográficas não influenciam a diversidade encontrada. Da mesma forma, não existe nenhum suporte estatístico para as correlações (Spearman) entre distância geográfica relativa e  $Nm$  ( $p= 0,27$ ) e  $G_{ST}$  ( $p= 0,27$ ), respectivamente entre os *M. microlepis* do Alto Iguaçu. Tais evidências apontam para a necessidade premente de estudos ecológicos com as mesmas e outras amostras desta região, a fim de testar a hipótese de que a diversidade genético-evolutiva observada (Figuras 5 e 6) seja uma consequência de eventos de radiação adaptativa ou evolução ecológica.

Por outro lado, as médias das distâncias genéticas (Tabela 7) observadas entre tais amostras apresentaram-se em níveis muito similares àqueles observados por Lehman *et al.* (2000). Estes autores usaram de marcadores RAPD objetivando acessar o relacionamento genético entre espécies do gênero *Anguilla*, observando distanciamento genético intraespecífico variando de 0,134 até 0,286. Congiu *et al.*, (2002) identificaram distâncias genéticas, baseadas em marcadores RAPD, variando desde 0,016 até 0,252 em 13 amostras de *Atherina boyeri* (Atherinidae),

sugerindo que se tratava de uma única população. Segundo Thorpe (1982), distâncias genéticas abaixo de 0,3 parecem estar associadas a distanciamentos existentes dentro de populações. Portanto, os valores médios de distanciamento genético entre os exemplares de *M. microlepis* do Alto Iguaçu parecem não serem suficientes para sustentar a idéia de diversidade acima sugerida. Porém, tal diversificação pode ter sido de tal forma recente, a ponto de que apenas dados mais sensíveis, tais como os parâmetros populacionais de Wright (1978), sejam capazes de identificar tal diversificação.

Todavia, dados cromossômicos indicam que pode existir, de fato, fluxo gênico entre alguns *M. microlepis* dos riachos componentes do Alto Iguaçu. Amostras de exemplares desta espécie, oriundos dos rios Piraquara e Pequeno apresentaram a mesma macroestrutura cariotípica ( $2n=52/12M+18SM+14ST+8A$ ), além dos cístrons ribossomais localizados no mesmo par de cromossomos (5º) (Nardino, 2004; Motta, 2004). Adicionalmente, amostragens desta espécie na calha principal do rio Iguaçu, apontaram para uso desta região do rio por *M. microlepis*, sugerindo a vagilidade da espécie ao longo deste sistema hídrico (Ingênito *et al.*, 2004). Um suporte adicional para a hipótese de ocorrência de fluxo gênico entre *M. microlepis* destes riachos é mostrado na Tabela 9. O patamar de fluxo gênico entre os exemplares destes dois riachos, estimado pelo cálculo de  $Nm$ , mostra-se no nível de 1,018 migrantes por geração, o que sugere fluxo gênico suficiente em favor da homogeneização do patrimônio genético (conforme Almeida *et al.*, 2003). Por outro lado, a comparação do parâmetro de diversidade interpopulacional ( $G_{ST}$ ), baseada na diversidade genética de *M. microlepis* das localidades acima mencionadas, sugere alguma estruturação ocorrendo entre tais exemplares (0,329). Uma possível explicação poderia ser a ocorrência de um recente isolamento entre tais populações locais, preferencialmente de natureza ecológica. Evidências que corroboram esta hipótese são relações genéticas e evolutivas apresentadas nas Figuras 5 e 6, onde as amostras dos rios Piraquara e Pequeno se caracterizam por serem genética e evolutivamente diferentes.

#### **4.2.2 Planície Costeira**

O padrão de estruturação apresentado pelos *M. microlepis* da Planície Costeira (Figuras 5 e 6), sugere que as mesmas podem se constituir em

representantes de populações isoladas ou já terem alcançado o status de unidades evolutivamente significativas (Ryder, 1986; Moritz, 1994; Eizirik, 1996). Esta hipótese é corroborada pelo fato das amostras compreenderem riachos isolados tanto regionalmente (Planície Costeira paulista, Planície Costeira paranaense e Planície Costeira catarinense) quanto entre as regiões (Planície Costeira paulista x Planície Costeira paranaense x Planície Costeira catarinense). O endemismo, como consequência do isolamento da fauna de peixes de água doce na drenagem costeira do Sudeste/Sul do Brasil, foi documentado por Menezes (1994; 1996). Como suporte da hipótese relativa ao endemismo de *M. microlepis* na Planície Costeira, estão os resultados apresentados por Mamuris *et al.*, (1998), estudando amostras de *Mullus barbatus* e *Mullus surmuletus* (Mullidae). Com base em marcadores RAPD, os autores identificaram um distanciamento genético entre as espécies variando desde 0,4103 até 0,4293. Govindaraju & Jayasankar (2004) em estudo a espécies do gênero *Epinephelus* (Serranidae), observaram o distanciamento genético variando de 0,3233 a 0,4599 entre 6 das 7 espécies estudadas. Ao se comparar as médias das distâncias genéticas (Tabela 7) identificadas entre as amostras de *M. microlepis* da Planície Costeira, observa-se em 70% das comparações pareadas, níveis relativamente similares com os valores acima mencionados e acima de 0,3. Segundo Thorpe (1982) níveis de distanciamento genético acima de 0,3 normalmente diferenciam muitas espécies. Além disso, dados cromossômicos indicaram que amostras de *M. microlepis* nativas das planícies costeiras de São Paulo e de Santa Catarina, podem constituir-se em táxons diferenciados, tendo em vista a ampla diversidade de número e posição dos cístrons ribossomais (Guimarães *et al.*, 1995). Um suporte adicional para esta hipótese advém do cálculo dos parâmetros populacionais  $N_m$  e  $G_{ST}$  (respectivamente, 0,4019 e 0,5544; Tabela 9) entre todas as amostras da região. Estes índices apontam para ocorrência de acentuada diferenciação entre as populações locais, associada a um baixo número de migrantes por geração.

Entretanto, a correlação de Spearman apresentada na Figura 9 não apresenta nenhuma sustentação estatística ( $r = 0,54$ ;  $p = 0,1$ ). Tal evidência sugere, portanto, que a diversidade observada entre os *M. microlepis* das três regiões costeiras estudadas, como resultado de isolamento, não sofre influência das distâncias geográficas. Assim, parece que independente das distâncias geográficas, o isolamento pelas cadeias montanhosas da Serra do Mar, que dividiu as três



Planícies Costeiras estudadas, exerce um papel muito mais efetivo sobre a diversidade observada entre os *M. microlepis* destas regiões. As comparações pareadas do  $Nm$  e  $G_{ST}$  (Tabela 9) entre as referidas amostras parecem constituir-se como evidências para a hipótese de diversidade observada na região, sendo esta o resultado de processos vicariantes. Portanto, das 10 comparações pareadas para  $G_{ST}$ , 90% delas apresentaram valores acima de 0,27 (Tabela 9, acima da diagonal). Para as comparações entre os  $Nm$  pareados, 80% delas apresentaram valores abaixo de 1 migrante por geração (Tabela 9, abaixo da diagonal). As Figuras 5 e 6 caracterizam-se ainda como suportes adicionais para a idéia de estruturação genética, associada à diversificação evolutiva entre as amostras de *M. microlepis* da Planície Costeira, uma vez que podem ser observados 4 unidades genéticas distintas por Neighbor-Joining: rio Acaraí (SC), rio Ribeirão (PR) e rios Mongaguá e Caixa d'Água (SP). Além disso, pela análise de parcimônia, as mesmas amostras se caracterizaram como 4 clados monofiléticos (Figura 6). Portanto, os dados aqui disponibilizados corroboram a hipótese de especiação acima descrita.

#### **4.2.3. Serra do Mar e a filogeografia de *M. microlepis***

Uma barreira geográfica se constitui como toda e quaisquer características do ambiente terrestre que exerça alguma influência inicialmente sobre a distribuição espacial das populações dos organismos e, posteriormente, sobre o fluxo gênico entre as mesmas populações. Como exemplo, sabe-se que a origem do istmo do Panamá, na sua feição atual, se originou à cerca de 3,1 a 3,5 milhões de anos (Coates & Obando, 1996). Tal alteração geomorfológica exerceu uma forte influência na subdivisão da espécie *Chelonia mydas* (tartaruga verde) que hoje se apresenta como duas unidades evolutivamente significativas: uma espacialmente distribuída pela região oceânica do Atlântico-Mediterrâneo e outra pela região Indo-Pacífica (Bowen, 1992).

Nesse sentido, seria a cadeia montanhosa constituinte da formação Serra do Mar a causa da potencial diversificação da ictiofauna, tendo em vista as suas porções costeiras e continentais? Suspeita-se que a resposta seja sim, uma vez que se torna muito curiosa a ocorrência 16 espécies de peixes de água doce que compartilham o mesmo padrão de distribuição espacial: continental para o Alto Iguaçu e costeiro no estado do Paraná (Abilhoa & Boscardim, 2004; Abilhoa, 2005).

Além disso, tal distribuição sugere a possibilidade de uma forte relação biogeográfica entre as regiões mencionadas.

As relações genéticas e evolutivas apresentadas nas Figuras 5 e 6 mostram uma forte evidência de que a Serra do Mar deve estar associada à diversificação de *M. microlepis*. Tal diversificação se torna evidente pela ocorrência de 8 unidades genético-evolutivas: (1) rio Água Verde, (2) rio Pequeno, (3) rio da Várzea, (4) Piraquara, (5) rio Acarai, (6) rio Ribeirão (7) rio Mongaguá e (8) rio Caixa d'Água. Além destas unidades, a amostra de *M. microlepis* do rio Caerana apresentou-se como uma unidade genética distinta, porém sem identidade evolutiva própria. A Tabela 9 apresenta as comparações entre os valores  $Nm$  e  $G_{ST}$  entre todas as amostras de *M. microlepis* e parece se constituir numa boa evidência de suporte para a hipótese de especiação acima sugerida. Assim, 90% de todas as comparações pareadas mostram  $Nm < 1$  e  $G_{ST} > 0,25$ , sugerindo uma intensa estruturação genético-evolutiva entre os *M. microlepis* estudados.

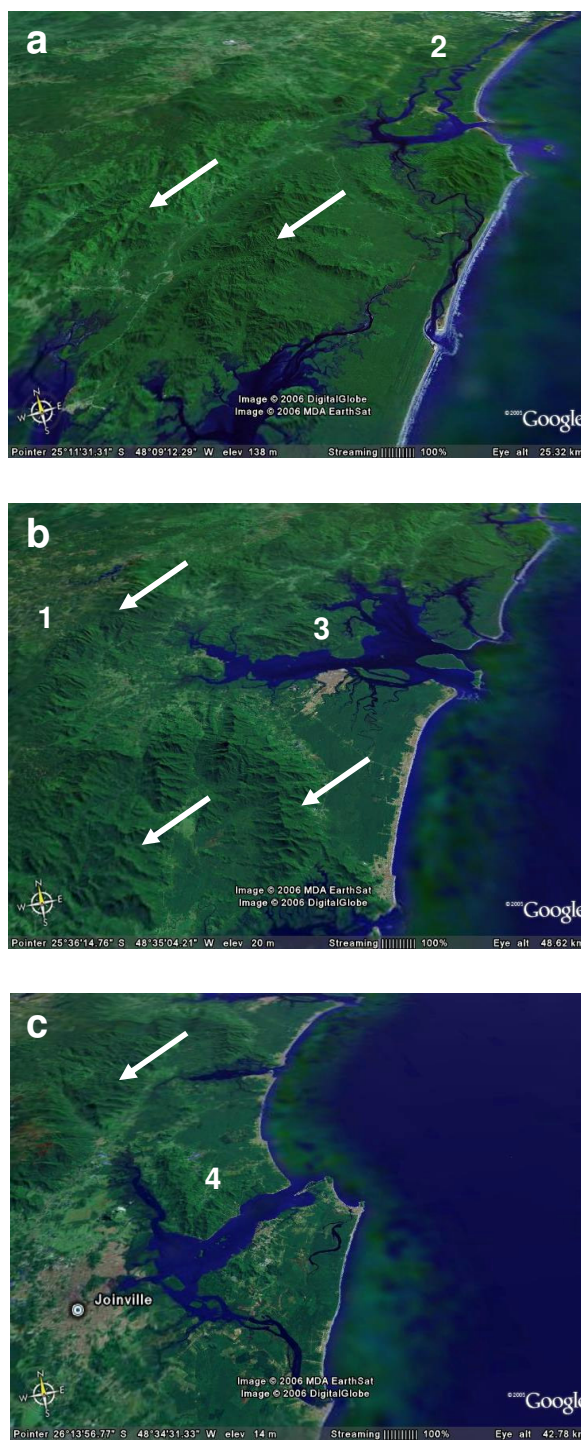
Além disso, estas oito unidades parecem estar inseridas dentro de quatro áreas biogeográficas naturais: (1) Alto Iguaçu, (2) Planície Costeira paranaense, (3) Planície Costeira do Norte de Santa Catarina e (4) Planície Costeira Sul de São Paulo. Como forma de suporte desta hipótese, podem ser identificadas como barreiras de isolamento, respectivamente, o corpo principal da Serra do Mar no estado do Paraná com picos alcançando cerca de 1800m de altitude (Almeida & Carneiro, 1998) e o divisor de águas entre as planícies costeiras de São Paulo e Paraná (complexo montanhoso que se estende desde as baías de Guaraqueçaba e Pinheiros até o estuário de Cananéia, SP; mencionado por Almeida & Carneiro, 1998). Mais a Sul, se encontra a Serra da Prata que se configura como o divisor de águas entre as planícies costeiras dos estados do Paraná no seu extremo sul e Santa Catarina (Figura 17; Angulo, 2004).

Uma interessante observação, segundo a análise de parcimônia (Figura 6), acerca dos princípios e processos que governaram a distribuição atual das linhagens genéticas e evolutivas de *M. microlepis* na região, é a de que a colonização da região do Alto Iguaçu parece ter ocorrido a partir da linhagem oriunda do rio Acarai. Esta curiosa situação poderia ser explicada por eventos de captura de cabeceiras. Neste caso específico, o rio Iguaçu poderia ter capturado a cabeceira do proto-Várzea que drenaria originalmente para o litoral mais a Sul, uma vez que *M. microlepis* do rio Acarai caracteriza-se como grupo irmão daquelas

populações locais da região do Alto Iguaçu. Eventos de captura de cabeceiras envolvendo as regiões mencionadas vem sendo uma forte evidência para explicar as relações genéticas e de origem de *H. malabaricus* na região costeira do Paraná e o Alto Iguaçu. (Lemos *et al.*, 2002; Vicari *et al.*, 2006). Além destas evidências, o entendimento das relações genético-evolutivas sugere, sobretudo pela análise filogenética (Figura 6), que a conquista dos formadores do Alto Iguaçu se deu em um momento mais recente de diversificação, quando comparado àqueles relativos à região costeira

Como já mencionado anteriormente, *M. microlepis* na Planície Costeira parece ter se diversificado em quatro grupos monofiléticos bem definidos, com exceção dos exemplares do rio Mergulhão que se apresentou como um grupo parafilético (Figura 6).

Assim, parece que a colonização da Planície Costeira por *M. microlepis* se deu em direção ao Sul, pela conquista de regiões localizadas em latitudes maiores. As linhagens de *M. microlepis* que formam a unidade evolutiva do litoral



**Figura 13.** Região costeira Sudeste/Sul do Brasil com as cadeias montanhosas constituintes da Serra do Mar na região estudada (a-c). 1-Alto Iguaçu, 2-Planície Costeira PR, 3-Planície Costeira do Norte SC e 4-Planície Costeira Sul de SP, as quais abrigam as 4 áreas biogeográficas propostas como hospedeiras das 8 unidades genético-evolutivas. As setas em branco identificam as barreiras de isolamento entre as unidades biogeográficas.

do estado de São Paulo, parecem ter sido originadas num momento histórico de subdivisão biogeográfica mais antigo, do que aquele que subdividiu as linhagens localizadas no litoral paranaense (rios Mergulhão e Ribeirão) e Norte do litoral de Santa Catarina (rio Acarai). Tal hipótese se torna lógica e mais consistente tendo em vista a distribuição de *M. lateralis* e *M. reocharis*, os grupos irmãos de *M. microlepis*. Ambas as espécies apresentam as suas distribuições geográficas, até o atual momento, como sendo essencialmente costeiras (Weitzman *et al.*, 1988; Menezes & Weitzman, 1990). Portanto, tal evidência reforça a hipótese da diversificação mais pretérita na região litorânea no sentido Norte/Sul, uma vez que *M. reocharis* (uma das espécies mais derivada do gênero) distribui-se por riachos costeiros da região fronteira dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Weitzman *et al.*, 1988; Menezes & Weitzman, 1990). Como mencionado anteriormente, a colonização e diversificação na região do Alto Iguaçu teria se dado à posteriori do evento de diversificação mencionado acima.

Padrões de relacionamento filogenético entre populações, baseados em dados moleculares e que corroboram padrões de distribuição geográfica, já foram evidenciados em espécies de peixes (Perdices *et al.*, 2002; Chen & Borowsky, 2004; Strecker *et al.* 2004; García *et al.*, 2004). Nesse sentido, uma interessante evidência aqui demonstrada, é a relação genético-evolutiva observada entre as regiões costeiras. Portanto, conclui-se que tais regiões parecem exibir um padrão filogeográfico, tendo em vista as relações genéticas e evolutivas aqui identificadas para as amostras estudadas de *M. microlepis* (Figuras 5 e 6).

Uma importante consideração, acerca do entendimento de todo o panorama filogeográfico apresentado acima, é a questão temporal. Dados geológicos relativos a paleoníveis do mar, bem como paleolinhas de costa sugerem a ocorrência de uma transgressão/regressão marinha Pleistocênica-Holocênica. Tal fenômeno sugere o valor máximo do nível do mar com 8 metros acima do atual (120.000 anos) e o mínimo de – 120 metros (17.500 – 6.500 anos) (Suguio *et al.*; 2005). Considerando que os registros fósseis apontam para o Mioceno médio (24-10 Ma; Lundberg 1997; Lundberg *et al.*, 1998) como o período de origem dos gêneros e espécie de peixes neotropicais atuais, conclui-se que *M. microlepis* já se encontrava distribuído pelas regiões aqui amostradas, no período geológico acima mencionado (120.000 anos até os dias atuais). Porém, entre 6.500 e 7.000 anos o paleonível do mar atingiu o nível atual, alcançando um máximo de 4 a 5 metros acima do que é observado hoje.

Após 5.500 anos atrás o paleonível do mar sofreu uma descensão progressiva até os níveis atuais observados (Suguio *et al.*, 2005).

Assim, sugere-se que o cenário genético-evolutivo (Figuras 5 e 6) aqui apresentado, relativo às amostras costeiras, compreenderia vários eventos de retração e expansão demográfica de *M. microlepis*. Nos eventos de retração, provavelmente a deriva genética, associada ao isolamento intra e inter-regional, teriam sido as forças motrizes geradoras da alta diversidade genética observada entre estas amostras, tal como mencionado anteriormente. Por outro lado, os resultados apresentados na Tabela 9, sugerem uma sutil tendência à diversificação de *M. microlepis* tanto no litoral do Paraná, quanto no litoral de São Paulo. Os valores de  $Nm$  entre as populações locais em ambas as regiões favoreceram a homogeneização (respectivamente 1,345 e 1,557). Porém, os valores de  $G_{ST}$  (respectivamente, 0,270 e 0,243) indicaram uma tendência à diversificação evolutiva entre os *M. microlepis* da região costeira do Paraná. Tal incongruência poderia ser explicada como o resultado de uma subdivisão recente (Figuras 5 e 6), onde as variações interespecíficas seriam a consequência da ação do último evento de deriva genética, devido à última regressão marinha ocorrida a 5.500 anos atrás (Suguio *et al.*, 2005).

Por conseguinte, a partir de 5.500 anos atrás, um estágio de recolonização destas áreas (região costeira do sul do estado de São Paulo, região costeira do estado do Paraná e litoral catarinense) foi estabelecido, determinando assim o padrão atual de distribuição espacial da espécie na região, consolidando um rápido e acentuado padrão filogeográfico tal como observado.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande missão da biologia da conservação é proteger a diversidade biológica e os processos que sustentam isso, em face das perturbações causadas pelas atividades humanas. O grande desafio dos biólogos conservacionistas é desenvolver estratégias práticas para alcançar o objetivo da conservação e reconhecendo que: (a) o conhecimento é incompleto acerca dos padrões e processos biológicos, (b) que as perturbações ambientais naturais ou antropogênicas são inevitáveis e (c) os conflitos entre as necessidades da diversidade biológica e a sociedade humana são comuns e devem ser reconciliados, tendo em vista a elaboração das prioridades de conservação (Moritz, 2002). Tais argumentações exigem a concatenação das evidências sobre ecologia, sistemática e biologia evolutiva (Bowen, 1999).

Nesse sentido as evidências aqui geradas sobre as amostras locais, geograficamente isoladas ou não, de *M. microlepis*, encontram-se de acordo com as exigências acima descritas. Tais evidências apresentam uma perspectiva de natureza genética, para os fins de concordância entre as necessidades do desenvolvimento humano nas regiões amostradas e, a igual necessidade de preservação da biodiversidade nas mesmas regiões, uma vez que ambientes biologicamente estáveis tendem a ser também estáveis em desenvolvimento.

O principal interesse da genética da conservação é a reflexão acerca da manutenção da aptidão biológica e da capacidade de respostas evolutivas perante alterações ambientais, por meio da manutenção da diversidade genética (Hedrick, 1996). Neste sentido, a origem de tal diversidade pode ser compreendida por meio da ação de duas forças: pela evolução adaptativa ou também como resultado de um longo tempo de isolamento (vicariância). Os dados aqui disponibilizados apresentam-se como evidências de suporte a esta última consideração, tendo em vista que ambas as situações (evolução adaptativa e vicariância) podem ser atribuídas, respectivamente: (a) àquela tendência de estruturação observada na amostras do Alto Iguaçu e (b) à diferenciação encontrada entre o estoque continental e o costeiro (Figuras 5, 6 e 10; Tabelas 7, 8, 9 e 10), bem como entre amostras ao longo da Planície Costeira (Figuras 5 e 6; Tabelas 7, 8 e 9).

De acordo com Moritz (2002), existe uma ampla discussão acerca da busca por um critério de definição de áreas prioritárias para a conservação. A essência de

tal discussão se alicerça na utilização do critério da riqueza de espécies ou deste, combinado àquele relativo à manutenção dos gradientes de diversidade genética dentro das espécies. Dessa forma, três categorias de condutas de preservação são sugeridas e, uma delas é corroborada pelo cenário genético, evolutivo e filogeográfico observado para *M. microlepis*. Tal conduta enfatiza a manutenção das partes, ou seja, preservar as regiões que possam maximizar a representação de espécies ou, que sejam preservados os segmentos de uma espécie de ampla distribuição geográfica, cujas partes tenham sido isolados historicamente.

Mediante a forte tendência à diversificação aqui observada para *M. microlepis*, se faz necessário portanto, entender a região amostrada como um importante criatório de espécies, uma vez que os dados aqui disponibilizados sugerem a existência de quatro áreas biogeográficas distintas: Alto Iguaçu, Planície Costeira sul de São Paulo, Planície Costeira do Paraná e Planície Costeira do Norte de Santa Catarina. Como incremento de tal sugestão, está a identificação de 8 grupos genético-evolutivos distintos, sendo abrigados ao longo destas quatro áreas biogeográficas (Figura 13).

Finalmente, a perspectiva genético-evolutiva e filogeográfica apresentada neste estudo reforça a importância da caracterização de espécies de peixes Neotropicais, bem como a sugestão de conservação dos seus ambientes, uma vez que muito pouco é de fato conhecido sobre a diversidade íctica desta região (Lovejoy & Araújo, 2000). Além disso, num futuro em médio e longo prazo, em meio ao desenvolvimento globalizado, tornar-se-ão potências, as nações que ao longo de sua evolução sócio-econômica, destinaram a devida atenção à identificação e preservação dos seus recursos biológicos (Torres, 2003).

## 6 CONCLUSÕES

Após a discussão e avaliação dos dados obtidos, foi possível reafirmar que, marcadores moleculares RAPD, realmente apresentam-se como uma excelente ferramenta para estudos sobre diversidade genética intraespecífica de peixes neotropicais.

Foi corroborada a hipótese de que são necessários no mínimo seis *primers* e pelo menos 50 loci (marcadores) para se obter uma boa consistência e resolução analítica dos dados.

Foi observada para *M. microlepis* uma diversidade genética global (95,4%), a qual sugere que esta espécie encontra-se em um excelente estado de conservação ao longo da área estudada ou, que boa parte desta diversidade advém da existência de diferentes espécies ainda não reconhecidas sob o ponto de vista taxonômico.

Os dados apresentados para a diversidade genética observada nas amostras locais, bem como as relações genético-evolutivas, apontam para as amostras dos rios Mergulhão e Caerana como aquelas que devem possuir mais plasticidade fenotípica entre todas as amostras estudadas.

Quando observada a diversidade genética própria de cada amostra, revelou-se que as amostras litorâneas parecem reter mais diversidade genética do que aquelas oriundas do Alto Iguaçu, com exceção da amostra do rio Acaraí (Planície Costeira) e da amostra do rio Caerana (alto Iguaçu).

Apesar das amostras de *M. microlepis* do Alto Iguaçu, tenderem a estruturação, são necessários estudos de natureza ecológica para a sustentação da hipótese de que estas constituam-se já em populações isoladas à partir de radiação ou evolução adaptativa.

As amostras de *M. microlepis* oriundas da Planície Costeira parecem representar populações isoladas ou até mesmo já terem alcançado o status de unidades evolutivamente significativas.

A cadeia montanhosa constituinte da formação da Serra do Mar parece realmente ter exercido uma forte influencia na diversificação de *M. microlepis*, uma vez que foram observadas oito unidades genético-evolutivas distintas: (1) rio Água Verde, (2) rio Pequeno, (3) rio da Várzea, (4) Piraquara, (5) rio Acarai, (6) rio Ribeirão (7) rio Mongaguá e (8) rio Caixa d'Água. Além destas unidades, a amostra de *M. microlepis* do rio Caerana apresentou-se como uma unidade genética distinta,



porém sem identidade evolutiva própria. Além disso, quatro áreas biogeográficas puderam ser identificadas: Alto Iguaçu, região costeira do sul do estado de São Paulo, região costeira do estado do Paraná e litoral Norte catarinense.

Os dados aqui disponibilizados indicam a necessidade premente de uma revisão taxonômica na espécie.

A interação dos estudos de diversidade genética com as evidências geográficas, geológicas e paleográficas permitiu um entendimento acerca dos padrões filogeográficos entre as amostras de *M. microlepis* na região estudada. De forma conclusiva, tal entendimento vem de encontro substancialmente às propostas mais modernas sobre a manutenção dos processos históricos naturais (evolução adaptativa e vicariância) que objetivem a conservação de uma diversidade biológica eminente.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABILHOA, V. & BOSCARDIM, C. (2004). **A ictiofauna do Alto curso do Rio Iguaçu na região metropolitana de Curitiba, Paraná: perspectivas para a sua conservação.** Sanare, Revista Técnica da Sanepar, 22(22): 58-65.
- ABILHOA, V. (2005). **Ictiofauna.** pp: 437-456. In: ANDREOLI, C.V. & CARNEIRO, C. **Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados.** Ed. Gráfica Capital, LTDA. 500p.
- ALI, B.A.; HUANG T.-H.; QIN, D.-N. & WANG, X.-M (2004). **A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research.** Reviews in Fish Biololy. Fisheries, 14: 443–453.
- ALMEIDA, F.F.M. & CARNEIRO, C.D.R. (1998). **Origem e evolução da Serra do Mar.** Revista Brasileira de Geociências, 28(2): 135-150.
- ALMEIDA, F.S., FUNGARO, M.H.P. & SODRÉ, L.M.K. (2001). **RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil .**Journal of Zoology, 253: 113-120.
- ALMEIDA, F.S., SODRÉ, L.M.K. & CONTEL, E.P.B. (2003). **Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil).** Genetic and Molecular Biology, 26(3): 301-305.
- AMEMIYA, C.T. & GOLD, J.R. (1988). **Chromossomal NORs as taxonomic and systematic characters in North American cyprinid fishes.** Genetica, 76: 81-90.
- AMOS, W. & HARWOOD, J. (1998). **Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations.** Philosophical Transactions The Real Society, 353: 177-186.
- ANGULO, R. J. (2004). **Mapa cenozóico do litoral do Estado do Paraná.** Boletim Paranaense de Geociências, 55: 25-42.
- ASMUS, H. E. & FERRARI, A. L. (1978). **Hipótese sobre a causa do tectonismo cenozóico na região sudeste do Brasil.** Projeto REMAC 4 , PETROBRÁS, Rio de Janeiro, Rj.
- AVISE, J.C. (1994) **Molecular Markers, Natural History and Evolution.** Chapman & Hall, New York.
- AVISE, J.C. (2000). **Phylogeography. The history and formation of species.** Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- BAGUETTE, M. (2004). **The classical metapopulation theory and the real, natural world: a critical appraisal.** Basic and Applied Ecology. 5: 312-224.

- BARDAKCI, F. (2001). **Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.** Turk Journal Biology. 25: 185-196.
- BEHEREGARAY, L. B.; SUNNUCKS, P. & BRISCOE, D.A. (2001). **A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex.** Proceedings Biological sciences The Real Society 269: 65-73.
- BERMINGHAM, E., & MORITZ, C. (1998). **Comparative phylogeography: concepts and appications.** Molecular Ecology, 7: 367-369.
- BERMINGHAM, E., & MARTIN, A.P., (1998). **Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing sharded history to infer the evolutionary landscape of lower Central America.** Molecular Ecology, 7: 499-518.
- BERNATCHEZ, L. & WILSON, C.C., (1998). **Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes.** Molecular Ecology, 7: 431-452.
- BORÉM, A. & SANTOS, F.R. (2001). **Biotecnologia simplificada.** Suprema Gráfica e Editora, Viçosa, MG.
- BRANT, S.V. & ORTÍ G. (2003). **Phylogeography of the Northern short-tailed shrew, *Blarina brevicauda* (Insectivora: Soricidae): past fragmentation and postglacial recolonization.** Molecular Ecology, 12: 1435–1449.
- BOWEN, S.H. 1992. **Quantitative description of the diet.** In Fisheries techniques (L.A. Nielsen & D.L. Johnson, eds.). American Fisheries Society, Bethesda, p. 325-336.
- BOWEN, B. W. (1999). **Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy.** Molecular Ecology. 8(12 Suppl): S3-S10.
- CARVALHO, G. R., (1993). **Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation.** Journal of Fish Biology 43: 53–73.
- CASTRO R.M.C., RIBEIRO A., BENINE R.C. & Melo, A.L.A. (2003). ***Lophiobrycon weitzmani*, a new genus and species of glandulocaudine fish (Characiformes: Characidae) from the rio Grande drainage, upper rio Paraná system, southeastern Brazil.** Neotropical Ichthyology 1(1): 11-19.
- CALENDINI, F. & MARTIN J.-F. (2005). **PaupUP v1.0.2032.22590 Beta.** A free graphical frontend for Paup\* Dos software.
- CHEN, K-c & BOROWSKY, R. (2004). **Comparative phylogeography of *Xiphophorus variatus* and *Heterandria jonesi* (Poeciliidae) using RAPD.** Ichthyological Exploration Freshwaters, 15(1): 25-40.

- COATES, A. G & OBANDO, J. A. (1996) **The geologic evolution of the Central American isthmus** Pp. 21–56 in JACKSON, J. B. C.; BUDD, A. F. & COATES A. G., eds. **Evolution and environment in tropical America**. University of Chicago Press, Chicago
- CONGIU L.; ROSSI R. & COLOMBO G. (2002). **Population analysis of the sand smelt *Atherina boyeri* (Teleostei Atherinidae), from Italian coastal lagoons by random amplified polymorphic DNA**. Marine Ecology Progress Series, Vol. 229: 279–289.
- da SILVA, M.N.F. & PATTON, J.L. (1998). **Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals**. Molecular Ecology, 7: 475-486.
- DERGAM, J.A.; SUZUKI, H.I.; SHIBATTA, O.A.; DUBOC, L.F.; JÚLIO Jr, H.F.; GIULIANO-CAETANO, L. & BLACK IV, W.C. (1998). **Molecular biogeography of Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi, and Paraná Rivers**. Genetics and Molecular Biology, 21(4): 493-496.
- DERGAM, J.A.; PAIVA, S.R.; SCHAEFFER, C.E.; GODINHO, A.L. & VIEIRA, F. (2002). **Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil**. Genetics and Molecular Biology, 25(4): 379-387.
- DOBZHANSKY, T. (1950). **Mendelian populations and their evolution**. American and Naturalist. 84:401-418.
- DYER, R.J. (2005) **Gene: A server based analysis of pollen pool structure**. Molecular Ecology Notes 14:971-973.
- EIZIRIK, E. (1996). **Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito das unidades evolutivamente significativas**. Brazilian Journal Genetics 19(4) Supl.: 23-29.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E. & QUATTRO, J.M. (1992). **Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data**. Genetics, 131: 479-491.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. (1995). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2° ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, pp.220.
- FITCH, W.M. (1971). **Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology**. Systematic Zoology, 20: 406-416.
- GALETTI Jr, P.M., FORESTI, F., BERTOLLO, L.A.C. & MOREIRA-FILHO, O. (1984). **Characterization of eight species of Anostomidae fish on the basis of the nucleolar organizing region**. Caryologia 37: 401-406.

- GARCIA, G.; CLARAMUNT, S. & LALANNE, A.I. (2004). **Genetic differentiation among annual fishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in a Biosphere Reserve site from Uruguay.** *Environmental Biology of Fishes* 70: 247-256.
- GUIMARÃES, I.N., ALMEIDA-TOLEDO, L.F., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. & FILHO, S.A.T. (1995). **Cytogenetic studies of three species of *Glandulocaudinae* (Pisces, Characiformes, Characidae).** *Revista Brasileira de Genética*. 18(2): 185-189.
- GOLOBOFF, P.A. (2006). **Nona v. 2.0.** <http://www.cladistics.com/nona.htm>
- HADRY, H.; BALCIK, M. & SCHIERWATER, B. (1992). **Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology.** *Molecular Ecology* 1:53-63.
- HARTL, D.L. & CLARK, A.G. (1997). **Principles of Population Genetics.** Sinauer, Canadá, 542 pp.
- HATANAKA, T. and GALETTI Jr. P.M. (2003). **RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species.** *Genetics and Molecular Biology*, 26(1): 19-25.
- HEDRICK, P.W. (1996). **Conservation genetics and molecular techniques: a perspective.** Pp.: 459-477. In: SMITH, T.B. & WAYNE, R.K. (eds.). **Molecular genetic approaches in conservation.** Oxford University Press, NY, Oxford.
- HOLLINGSWORTH, P.M., ENNOS, R.A. (2004). **Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure.** *Heredity* 92, 490-498.
- INGENITO, L.F.S., DUBOC, L.F., ABILHOA, V. (2004). **Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto Rio Iguaçu, Paraná, Brasil.** *Arquivo de Ciências Zoológicas e Veterinária UNIPAR*, 7(1): 23-36.
- LAMPERT, V.R., AZEVEDO, M.A. & FIALHO, C.B. (2003). **Hábito alimentar de *Mimagoniates microlepis* STEINDACHNER, 1876 (Characidae: Glandulocaudinae) do canal de ligação entre as lagoas Emboaba e Emboabinha, Rio Grande do Sul, Brasil.** *Comum. Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, série Zoologia*, 16(1): 1-15.
- LEHMANN, D.; HETTER, H.; TARASCHEWISKI, H. (2000). **RAPD-PCR investigations of systematic relationships among four species of eels (Teleostei: Anguillidae), particularly *Anguilla anguilla* and *Anguilla rostrata*.** *Marine biology*, 137: 195-204.
- LEMOS, P.M.M.; FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C. & CESTARI, M.M. (2002). **Karyotypic studies on two *Hoplias malabaricus* populations (Characiformes, Erythrinidae) of the 2n=42 group, from the first plateau of the Iguaçu river basin (Paraná State, Brazil).** *Caryologia*, 55: 193-198.

- LEUZZI, M.S.P., ALMEIDA, F.S., ORSI, M.L. & SODRÉ, L.M.K. (2004). **Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil.** Genetics and Molecular Biology. 27, 3, 355-362
- LYNCH, M. & MILLIGAN, B.G. (1994). **Analysis of population genetic structure with RAPD markers.** Molecular Ecology. 3: 91-99.
- LOVEJOY, N.R. & ARAÚJO, L.G. (2000). **Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of genus *Potamorhaphis*.** Molecular Ecology. 9: 259-268.
- LUNDBERG, J.G. (1997). **Fishes of the La Venta fauna: additional taxa, biotic and paleoenvironmental implications.** In: KAY, R.F.; MADDEN, R.H.; CIFELLI, R.L. & FLYNN, J.J. (Ed) **Vertebrate Paleontology in the Neotropics: the Miocene Fauna of la Venta Colombia.** Smithsonian Institution Press, Washington, DC. pp. 67-91.
- LUNDBERG, J.G.; MARSHALL, L.G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M.C.S.L. & WESSELINGH, F. (1998). **The stage Neotropical fish diversification: a history of Tropical South American rivers.** Pp. 13-48 In: MALABARBA, REIS L.R.; VARI R.E., R.P., LUCENA, Z.M.S. & LUCENA, C.A.S. (Ed) **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes.** Edipucrs, Porto Alegre.
- MAMURIS Z., STOUMBOUDI Maria TH, COSTAS S., BARBIERI R. & MOUTOU KATERINA A. (2005). **Genetic variation in populations of the endangered fish *Ladigesocypris ghigii* and its implications for conservation.** Freshwater Biology (2005) 50, 1441-1453.
- MAZZONI, R. & IGLESIAS-RIOS, R. (2002). **Distribution pattern of two fish species in a coastal stream in southeast Brazil.** Brazilian Journal of Biology, 62(1): 171-178.
- MAYR, E. (1977). **Populações, espécies e evolução.** Editora da Universidade de São Paulo. 485p.
- MENEZES, N.A. (1988). **Implications of the distribution patterns of the species of *Oligasarcus* (Teleostei, Characidae) from central and southern South America.** In: W.R.Heyer & P.E. Vanzolini, eds. **Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns.** Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, RJ. Pp. 295-304.
- MENEZES, N.A. & WEITZMAN, S.H. (1990). **Two new species of *Mimagoniates* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to the Glandulocaudini fishes of Brazil and Paraguay.** Proceedings of Biological Society of Washington, 103(2): 380-426.
- MORITZ, C. (1994). **Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation.** Trends in Ecology and Evolution. 9(3): 373-375.

- MORITZ, C. (2002). **Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it.** *Systematic Biology*, 51(2): 238-254.
- MOTTA, T.S. 2004. **Análise cromossômica em espécies paranaenses da subfamília Glandulocaudinae (Teleostei:Characidae). Citogenética da população de *Mimagoniates microlepis* do rio Piraquara, Piraquara, PR.** Monografia de graduação. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UnicenP. 39p.
- MULLIS, K. & FALOONA, F. (1987). **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction.** *Methods in Enzymology*. 155:335-350.
- NARDINO, D. (2004). **Análise cromossômica em espécies paranaenses da subfamília Glandulocaudinae (Teleostei:Characidae). Citogenética da população de *Mimagoniates microlepis* do rio Pequeno, São José dos Pinhais, PR.** Monografia de graduação. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UnicenP. 32p.
- NEI, M. (1972). **Genetic distances between populations.** *Nature*. 106:283-292.
- NIXON, K.C. (2000). **Winclada v.0.9.99m24.** <http://www.cladistics.com/winclada.htm>
- PAGE, R. (2001). **NDE – Nexus data editor for Windows.** Software distribuído pelo autor.
- PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; MALCOLM, D.S.; BOOTON, G.C. & FUERST, P.A. (1998). **What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker.** *Ecology*, 79(2): 361-382.
- PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A. & DOADRIO, I. (2002). **Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 172–189.
- PRIOLI, S.M.A. *et al.*, (2002) **Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers.** *Genetics and Molecular Biology*, 25(4): 421-432.
- POSADA, D. & CRANDALL, K.A. (2001). **Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks.** *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 37–45.
- RICKLEFS, R.E. & SCHLUTER, D. (1993). **Species diversity in ecological communities: Historical and geographical perspectives.** University of Chicago Press, Chicago, IL.
- RYDER, O.A. (1986). **Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies.** *Trends in Ecology and Evolution*. 1(1): 9-10.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. & ARNHEIN, N. (1985). **Enzymatic amplification o *B*-globin genomic**

**sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.**  
Science 230:1350-1354.

SAITOU, N. & NEI, M. (1987). **The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** Molecular Biology and Evolution., 4: 406-425.

SAMBROOK J. & RUSSELL D.W. (2001). **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

SANTANNA, J.F.; VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; SHIBATTA, O.A. & ARTONI, R.F. (2006). **Ocorrência de *Mimagoniates microlepis* Steindachner, 1876 (Characidae, Glandulocaudinae) na bacia do Alto rio Tibagi.** Res. XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia. Res.2111.

SANTOS, S.; SCHNEIDER, H. & SAMPAIO, I. (2003). **Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis.** Genetics and Molecular Biology. 26(2):151-161

SEKINE, E.S., PRIOLI A.J, PRIOLI S. & JÚLIO Jr. H.F. (2002). **Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaíra Falls in the Paraná River.** Acta Scientiarum, Maringá, v.24, n.2, p. 507-512.

SOFIA, S. H., SILVA, C.R.M., GALINDO, B.A., ALEIDA, F.S., SODRÉ, L.M.K.& MARTINEZ, C.B.R. (2006). **Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an Urban Stream.** Hidrobiologia 553(1): 245-254.

STRECKER, U.; FAÚNDEZ, V.H. & WILKENS, H. (2004). **Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data.** Molecular Phylogenetics and Evolution, 33: 469–481.

SUGUIO, K.; ANGULO, R.J.; CARVALHO, A.M.; CORRÊA, I.C.S.; TOMAZELLI, L.J.; WILLWOCK, J.A. & VITAL, H. (2005). **Paleoníveis do mar e paleolinhas da costa.** In: SOUZA, C.R.G.; SUGUIO, K.; OLIVEIRA, A.M.S. & OLIVEIRA, P.E. **Quaternário no Brasil.** Holos Editora, pp. 114-129.

SWOFFORD, D. L.; (2000). **PAUP\*- Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). V.4.0b10.** Sinauer Associates, Sanderland, Massachusetts.

TABERLET, P.; FUMAGALLI, L.; WUST-SAUCY, A-G. & COSSON, J-F. (1998). **Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe.** Molecular Ecology, 7: 453-464.

TELLES, M.P.C. *et al.*, (2001). **Marcadores RAPD na análise de divergência genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a**



**estabilidade da divergência estimada.** Ciência Animal Brasileira, Goiânia, v.2, n.2, p. 87-95.

TEMPLETON, A. R (1998) **Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history.** Molecular Ecology, 7, 381–397.

TORRES, R.A.; FORESTI, F. & OLIVEIRA, C. (1998). **Comparative cytogenetic studies in alopatric populations of *Trichomycterus paolence* Eigenmann, 1918 from southeastern Brazil (Siluriformes, Trichomycteridae).** Cytologia, 63: 107-114.

TORRES, R. A. (2003). **New frontiers in conservation biology: The era of the genome.** Braziliam Journal of Nature Conservation . 1(2): 61-62.

TORRES, R. A.; OLIVEIRA, C. & FORESTI, F.; 2004a. **Cytotaxonomic diagnosis of *Trichomycterus diabolus* (Teleostei: Trichomycteridae) with comments about its evolutionary relationships with co-generic species.** Neotropical Ichthyology, 2 (3): 123-125.

THORPE, J.P., (1982). **The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics.** Annual Review Ecology and Systematics. 13: 139-168.

VENERE, P.C., & GALETTI Jr., P.M. (1989). **Chromossome evolution and phylogenetic relationships of some neotropical Characiformes of the family Curimatidae.** Revista Brasileira de Genética, 12: 17-25.

VICARI, M.R.; PAZZA, R.; ARTONI, R.F.; MARGARIDO, V.P. & BERTOLLO, L.A.C. (2006). **Cytogenetics and biogeography: considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçú river.** Brazilian Archives of Biology and Technology, 49 (2): 297-303.

WASKO, A.P. and GALETTI Jr., P.M. (2002) **RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species.** Hydrobiologia 474:131-137.

WEITZMAN, S.H., MENEZES, N.A. & WEITZMAN. M. J. (1988). **Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) whit comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil.** In: **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns** (Heyer, W.R. and Vanzolini P.E., eds.). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp. 379-427.

WELSH, J. & McCLELLAND, M. (1990). **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.** Nucleic Acids Research 18:7213-7218.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. (1990). **DNA polymorphisms amplified by arbitrary are useful as genetic markers.** Nucleic Acids Research 18:6531-6536.

- WRIGHT, S. (1978). **Evolution and genetics of populations**. Vol. 2: The theory of gene frequencies. University of Chicago *Press, London*. 511 pp.
- WONG, B. B. M., KEOGH J.S., & McGLASHAN, D. J . (2004). **Current and historical patterns of drainage connectivity in eastern Australia inferred from population genetic structuring in a widespread freshwater fish *Pseudomugil signifer* (Pseudomugilidae)**. *Molecular Ecology* 13:391–401
- YEH, F.C., BOYLE, T., YE, Z. & XIYAN, J.M. (1999). **POPGENE Version 1.31: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis**. University of Alberta and Center for International Forestry Research.

## **ANEXOS**

**Anexo I:** Matriz de presença e ausência dos perfis RAPDs (0 = ausência de banda; 1 = presença de banda).

Legenda: PIR= rio Piraquara; CAE= rio Caerana; PEQ= rio Pequeno; VAR= rio da Várzea; AGU= rio Água Verde; MER= rio Mergulhão; RIB= rio Ribeirão; MON= rio Mongaguá; ITA= rio Caixa d'Água; ACA= rio Acarai.

<i>M.lateralis1</i>	1100000110 0000000000 0000000000 0000100001 0000000000 0000010001 0000000000 0010000000 0001000001 0100010000 0000000000 0
<i>M.lateralis2</i>	1100000110 0000000000 0000000000 0000100001 0000000000 0000010001 0000000000 0010000000 0001000001 0100010000 0000000000 0
PIR1	0100000000 1101100111 0000110000 1010100001 110000010 0001001100 1101010111 1101100000 1000000001 0011100000 0011110011 1
PIR2	0100000000 1101100111 1000110100 1000000011 110000010 0000001100 1101010101 1101100000 1000000001 0001100000 0011111111 1
PIR3	0100000000 1101100111 0000110100 1010100011 110000010 0000001100 1101010110 1101100010 1000000001 0001000000 0011100111 1
PIR4	0100000000 0001100111 1000110100 1000100011 100000010 1000001100 1101010101 1101100010 1000000001 0001000000 0011100011 1
PIR5	0100000000 1001100111 0000110110 0000000011 000000010 0000001100 1101010111 1101100010 1000000001 0011101010 1011110111 1
PIR6	0100000000 1001100111 0000110100 1010010011 0010000010 1101001100 1101110100 1101000001 1000000001 0011101000 1011110110 1
PIR7	0100000000 0101100111 1000110100 0010010011 0110000011 1101001100 1101110110 1101000000 1000000001 0001100000 1011111111 1
PIR8	0100000000 1001100111 1000110100 0010010011 0100000000 0000001100 1101010100 1101100011 1000000001 0001100000 0011110111 1
PIR9	0100000000 1101100111 1000110100 1000100001 1100000000 0001001100 1101010100 1101000011 1000000001 0001100000 0011100111 1
PIR10	0100000000 1101100111 1000110000 1000000001 0000000000 0001001100 1101110100 1101000010 1000000001 0001100000 0011110111 1
CAE1	0100000000 0000000011 0000110100 1000100001 0011010000 0101000000 1101100000 0101011010 1110000001 0001100000 0000010110 0
CAE2	0100000000 0000000011 0000110000 0000000001 0101000000 0000000110 1101000011 0101110000 1110000001 1000100000 0000000000 0
CAE3	0100000000 0101000011 0000110100 1000110001 0001011000 0000000000 1101000011 0101110000 1010000001 1011100010 0010000010 0
CAE4	0100000000 1001000011 0000110100 1010000011 0110000000 0100000110 1111100010 0101110000 1110000001 1011100010 0010000010 0
CAE5	0100000000 0000000011 0000110000 0010100001 0001011000 0100000000 1111100000 0101011110 1000000001 0000100010 0000000100 0
CAE6	0100000000 0001000011 0000110100 1010000001 0110011011 1100100110 1111100011 0101010000 1110000001 1001100010 0010100111 0
CAE7	0100000000 1101000011 0000110000 0110000011 0110010010 1100001110 1101100001 0101110001 1110000001 1000100010 0010110111 0
CAE8	0100000000 0000000011 0000110000 0010000011 0100000000 0000000000 1111000000 0101110010 0000000001 1001100010 0000110110 0
CAE9	0100000000 0000000011 0000110000 1000110001 0010000000 1100101000 1111000011 1101111001 1010000001 0001100010 1011110111 1
CAE10	0100000000 0100000011 0000110010 0110000001 0110000000 1100101000 1111000001 1101111011 1110000001 1011100010 1010110111 1
PEQ1	0100001000 1001100011 0000110100 0110100001 0000010001 0101001100 0111000001 1101110000 1100000001 1000000010 0001101111 1
PEQ2	0100001010 1001100011 0000111100 1000010001 0100010001 0100101100 0111000000 1101010000 1010000001 1011001000 0000001111 0
PEQ3	0100001000 0101100011 0000111000 0000010001 0100010011 0100100100 0111000000 1101000100 0000000001 0011000010 0000001110 0
PEQ4	0100001010 0101100011 0000110100 1010100001 0000010011 0101001100 0111000000 1101100000 1110000001 0000000000 0000000011 0
PEQ5	0100001010 1101100011 1000110100 1010100001 1100010011 0101000100 0111000001 1101010000 1010000001 1011000010 0000000011 1
PEQ6	0100001000 1101100011 1000110000 1010010001 0110010011 0101000100 0111000001 1101111011 1110000001 0001000000 0010111111 1
PEQ7	0100001000 1101100011 1000110000 1010010001 0110010011 0100101100 0111000001 1101000000 1100000001 0010000010 0011111111 1
PEQ8	0100001000 1001100011 1000110100 0010100001 1010010011 0101101100 0111000001 1101110001 1010000001 0011001000 0001100111 1
PEQ9	0100001000 1001100011 0000110100 1010010001 1000010011 0100101100 0111000001 1101010001 1010000001 1010000010 0011100011 1
PEQ10	0100001000 1101100011 0000110100 0010100001 0000010011 0101001100 0111000000 1101110001 1110000001 1011000010 0000111111 1
VAR1	0100001011 1000100011 0000110100 0000010001 0001010000 0000000000 0100010000 1101000000 1000000001 0000000000 0010001111 0
VAR2	0100000000 0010100011 0000110000 0000000001 0001000000 0000000000 0100010000 1101000000 1000000001 0000000000 0010011011 1
VAR3	0100000000 0000000011 0000110100 0000100001 0001010011 0000001100 0100010000 1101000000 1000000001 1000000000 0010011111 1
VAR4	0100001011 1010000011 0000110000 0000010001 0001000000 1100001000 0100010000 1101000000 1000000001 0000000000 0010001111 1
VAR5	0100001000 1000100011 0000110100 0000010001 0001000011 0100001000 0100010000 1101000000 1000000001 0000000000 0000001111 1

VAR6	0100001011 0000100011 0000110100 0000110001 0001010000 0100001100 0100010000 1101000000 1000000001 0000000000 0000011111 1
VAR7	0100000000 0000100011 0000110000 0000000001 0001000000 0100000000 0100010000 1101000000 1000000001 0000000000 0000011111 1
VAR8	0100000000 0000000011 0000110100 0000000001 0001000000 0100000000 0100010000 1101000000 1000000001 0000000000 0000011110 0
VAR9	0100000001 1000100011 0000110000 0000000001 0001000000 0000000000 0100010000 1101000000 0000000001 0000000000 0000001101 0
VAR10	0100000001 1010000011 0000110100 0000010001 0001000000 0100000000 0100010000 1101000000 1000000001 0000000000 0000001100 0
AGU1	0100000001 0101100111 0000110100 0100010001 0000000000 0101000100 1101000000 0101110001 1110000001 0010000000 0010111111 0
AGU2	0100000001 1101100111 0000110100 1000010001 0000000000 0101000100 1101000001 0101110001 1110000001 0011000000 0001001111 1
AGU3	0100000001 0101100111 0000110100 1000010001 0010000000 1101000100 1101000000 0101110001 1010000001 0001000000 0010101011 1
AGU4	0100000001 1101100111 1000110100 0100110001 0010000000 1101000100 1101000000 0101010011 1110000001 0011000000 0001111010 1
AGU5	0100000001 1101100111 1000110100 1000110001 0000000000 1101000100 1101000000 0101110001 1110000001 0001000000 0001111011 1
AGU6	0100000001 1101100111 1000110100 0010010001 0000000000 1101000100 1101000000 1101110001 1110000001 0011000000 0010111010 1
AGU7	0100000001 1101100111 0000110100 1010110001 0000000001 0101000100 1101000000 1101110001 1110000001 0010000000 0010100010 1
AGU8	0100000001 1101100111 0000110100 0010010001 0010000001 1101000100 1101000000 0101010001 1110000001 0001000000 0001101011 1
AGU9	0100000001 1101100111 0000110100 1010110001 0010000000 1101000100 1101000000 0101110001 1010000001 0001000000 0001111011 1
AGU10	0100000001 1101100111 1000110100 1010110001 0000000000 1101000100 1101000000 0101110001 1110000001 0001000000 0011101111 1
MER1	0100000000 0101000000 0000100000 0000000001 0010000000 0000000000 0000101000 0011000000 0000000001 0000000000 0110001000 0
MER2	0100000000 0101010001 0100100000 0100000101 0010000000 0000000000 0000001000 1011000000 1000000001 1001001000 0100001000 0
MER3	0100000000 0111000011 1100100000 0101100111 1100000000 0000000000 0000001001 0011000000 0000000011 0001001001 0100001000 0
MER4	0100000000 0111000001 0000100000 1001000001 0010000000 0000000000 0000001000 1011000000 1000000011 1001000000 0000001000 0
MER5	0100000000 0101000010 0000100001 0000100001 1000000000 0000000000 0000001000 0011000000 1000000001 1001000000 0110101000 0
MER6	1100000000 0101000001 1000100000 0000000101 0000000000 0001000000 1100101000 1011000000 1000000001 0001000000 0000001001 0
MER7	1100010000 0111000001 1100100010 1111000011 0000000000 0001000000 1001001000 0011000000 1000000001 0000000000 0110001001 0
MER8	1100000000 0101001011 1110100001 1001000001 0010000000 0001000010 0000101000 0011000000 1000000001 0001100000 0110001001 0
MER9	1100000000 0101000000 0000100000 1000100011 0010000000 0001010010 1100001000 1011000000 1000000001 0001000000 0110101001 0
MER10	0100000000 0101100010 1100100000 0101100011 1100000000 0000000000 0100001000 1011000000 1000000001 0001100000 0100001000 0
RIB1	1101111010 0100101011 0110100010 1101100001 1000100000 0011110000 0100001000 1011000000 0000000001 0000000000 0110001001 0
RIB2	1101101010 0100111000 1100100010 1101100001 0000000000 0011110000 0000001000 1011000000 1000000001 0000000000 0110001001 0
RIB3	1100101010 0111101000 1100110010 1001010011 0000000000 0011000010 0000001000 1011000000 1000000001 0000000000 0110001001 0
RIB4	1111101010 0111001000 1100100000 1101110001 0010100000 0011010000 0000001000 0011000000 0000000001 0000000000 0100101001 0
RIB5	1100100111 0111101010 0110110010 1101100001 0100000000 0011010010 1000001001 1011000000 1000000001 0000000000 0100101001 0
RIB6	1101111110 0111111010 0100100010 1111010011 0010100000 0011000000 1100001000 0011000000 0000000001 0000000000 0110001001 0
RIB7	1101101010 0101111000 1100110000 1011100011 0000001000 0011110000 1000001001 0011000100 0000000001 0000000000 0110001001 0
RIB8	1101101110 0111101000 1100110010 1111110011 0000000000 0011000000 0100001000 0011000000 1000000001 0000000000 0010001001 0
RIB9	1111101110 0111101010 1000110000 1001110001 0010001000 0011000000 0100001001 1011000010 1000000011 0001100000 0110001001 0
RIB10	1111100110 0111101011 110110010 1011110001 0010000000 0011000000 1000001001 0011000010 1000000011 1001100000 0100001001 0
MON1	1100000000 0110001010 0000110011 0011000001 0000000100 0000001011 0111000001 0001000010 0001100011 0101011001 0100000100 0
MON2	1100000000 0110000010 1000101000 0011001001 0000000100 0001000011 0111100000 0011000010 0001100011 1100111001 0100000100 0
MON3	1100000000 0111000010 0000100010 1001110001 0000000100 0000000001 0011000001 0001000010 0001100011 0101011000 0100000100 0
MON4	1100000000 0110101010 1000111010 0001110111 0000000100 0001011001 0111000000 0011000010 0001101011 0000000101 0100000100 0
MON5	1100000000 0110100010 1010111011 0011000111 0000000100 0001011001 0111000000 0011000010 0001100011 0101101001 0100000100 0
MON6	1100000000 0110001010 1000111011 1011011111 0000000100 0001011001 0011100001 0011000010 0001101011 0100111001 0100000100 0
MON7	1101000000 0110000010 1000100011 1001010111 0000000100 0001010001 0011100001 0011000010 0001100001 0100111001 0000000100 0

MON8	1101000000 0110001010 1000101001 1001001101 0000000100 0001000001 0011000000 0011000010 0001100001 0000001000 0000000100 0
MON9	1101000000 0110101010 0010101010 0001001111 0010000100 0001011001 0011100001 0001000010 0001101011 0001001000 0100000100 0
MON10	1101000000 0110100010 1000100001 1001000001 0010000100 0001001001 0011100000 0011000010 0001100011 0101101001 0100000100 0
ITA1	1100000000 0111101010 0010100110 0011100001 0000000100 0001001001 0001100000 0011000000 0000010011 0000111001 1110000000 0
ITA2	1101010000 0111001010 0010100010 0001010001 0000000100 0001000001 0001100000 0011000000 0000010011 1011001001 0110000000 0
ITA3	1100010000 0111001010 0010100010 1001100001 0000000100 0001001001 0001100000 0011000000 0001011011 1011001001 0110000100 0
ITA4	1100010000 0111001010 0010100110 1001000111 0000000100 0001001001 0111100001 0001000000 0001010011 0001011001 0110000000 0
ITA5	1100100000 1111101010 0010100010 1011010001 0000000100 0001000001 0001100001 0001000000 0001111011 1000001001 0100000100 0
ITA6	1101101000 0111000010 0010100110 1001100111 0000000100 0001000001 0001100000 0001000000 0001111011 1001101000 1100000100 0
ITA7	1100001000 0111101010 0010100100 0010111011 0000000100 0001001001 0001100001 0001000000 0000111011 0101111000 1100000000 0
ITA8	1100001000 0111000010 0010100011 0011110111 0000000100 0001001001 0001100000 0011000010 0000010011 0100011000 1010000100 0
ITA9	1100100000 0111001010 0110100011 0000100111 0000000100 0001001011 0001100000 0011000000 0000011001 0001101000 1100000100 0
ITA10	1100010000 0111100010 0010100011 0011000111 0000000100 0001000001 0101100000 0011000000 0000011001 0001111000 1100000000 0
ACA1	0100010000 0101000010 1010111001 0010000001 0010100100 0000100010 1111111000 1001010110 1000001111 0111011000 0100001100 0
ACA2	0100010000 0101000010 1011111000 0010100001 0010100100 0000100010 1111111000 0001010110 1000001011 0111000100 0010001100 0
ACA3	0100010000 0101000011 1000111001 0010000001 0010000100 0000100010 1111111001 1001010110 1000001111 0101000100 0010001100 0
ACA4	0100010000 0101100011 1000111000 0010100001 0010000100 0000100010 1111111001 1001000100 1000001111 0111010100 0100001100 0
ACA5	0100010000 0101000010 1010111001 0011000001 0010100100 0000100010 1111111000 1001010110 1000001011 0111000100 1110001100 0
ACA6	0100010000 0101100011 1000111001 0010100001 0010000100 0000101110 1111111000 1001010110 1000001111 1101010000 0010001100 0
ACA7	0100010000 0101000011 1010111001 0011100001 0010100100 0000100010 1111111001 1001010110 1000001111 0111000100 0000001100 0
ACA8	0100010000 0101100011 1000111001 0011100001 0010000100 0000101100 1111111000 0001010110 1000001111 0111010000 0010001100 0
ACA9	0100010000 0101000011 1011111000 0010100001 0010000100 0000101000 1111111000 1001000100 1000001111 0101000000 1100001100 0
ACA10	0100010000 0101000011 1000111001 0010100001 0010000100 0000100000 1111111000 1001000100 1000001111 0111001100 0110001100 0

**Anexo II: Matriz de distância genética de Nei.**

Legenda: PIR= rio Piraquara; CAE= rio Caerana; PEQ= rio Pequeno; VAR= rio da Várzea; AGU= rio Água Verde; MER= rio Mergulhão; RIB= rio Ribeirão; MON= rio Mongaguá; ITA= rio Caixa d'Água; ACA= rio Acarai.

	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>M.lateralis</i> 1	-	0.00000	0.44144	0.45045	0.43243	0.39640	0.45946
2 <i>M.lateralis</i> 2	0	-	0.44144	0.45045	0.43243	0.39640	0.45946
3 PIR1	49	49	-	0.09910	0.08108	0.13514	0.14414
4 PIR2	50	50	11	-	0.09009	0.09009	0.11712
5 PIR3	48	48	9	10	-	0.09009	0.13514
6 PIR4	44	44	15	10	10	-	0.13514
7 PIR5	51	51	16	13	15	15	-
8 PIR6	53	53	18	19	19	21	16
9 PIR7	55	55	18	15	17	21	20
10 PIR8	48	48	17	10	12	14	13
11 PIR9	47	47	12	11	9	13	20
12 PIR10	45	45	14	11	15	15	16
13 CAE1	37	37	34	35	33	33	36
14 CAE2	32	32	31	32	34	32	33
15 CAE3	39	39	28	31	31	29	30
16 CAE4	45	45	28	31	27	33	30
17 CAE5	33	33	40	41	37	37	38
18 CAE6	51	51	32	33	31	33	34
19 CAE7	51	51	28	27	29	33	30
20 CAE8	34	34	31	28	28	30	27
21 CAE9	47	47	26	29	29	27	26
22 CAE10	53	53	30	33	33	35	28
23 PEQ1	46	46	29	28	28	28	29
24 PEQ2	45	45	36	31	33	35	34
25 PEQ3	40	40	35	32	34	36	35
26 PEQ4	38	38	27	30	26	26	35
27 PEQ5	46	46	25	28	28	28	35
28 PEQ6	55	55	26	25	27	31	34
29 PEQ7	52	52	23	22	26	30	29
30 PEQ8	51	51	24	27	25	25	28
31 PEQ9	50	50	27	28	28	26	29
32 PEQ10	50	50	27	28	28	32	29
33 VAR1	32	32	35	28	30	30	31
34 VAR2	29	29	28	25	29	25	28
35 VAR3	34	34	29	24	26	24	27
36 VAR4	34	34	35	30	32	30	33
37 VAR5	35	35	32	25	27	27	28
38 VAR6	34	34	33	28	30	28	31
39 VAR7	29	29	30	25	29	27	28
40 VAR8	27	27	34	27	31	29	30
41 VAR9	26	26	33	28	30	30	31
42 VAR10	29	29	38	31	33	33	34
43 AGU1	44	44	29	26	30	30	29
44 AGU2	46	46	25	22	26	26	27
45 AGU3	44	44	25	24	24	22	31
46 AGU4	47	47	28	29	29	27	32
47 AGU5	46	46	25	22	26	22	31
48 AGU6	48	48	25	24	28	26	29
49 AGU7	44	44	23	28	24	26	31
50 AGU8	46	46	27	28	26	28	33
51 AGU9	46	46	21	24	22	24	31
52 AGU10	48	48	25	22	22	22	31
53 MER1	19	19	40	39	39	39	44
54 MER2	27	27	42	41	41	41	44

55	MER3	31	31	44	39	43	39	48
56	MER4	25	25	38	37	37	37	44
57	MER5	23	23	36	35	35	33	42
58	MER6	25	25	36	33	37	33	40
59	MER7	32	32	41	38	40	38	45
60	MER8	33	33	40	39	43	41	48
61	MER9	26	26	33	34	32	32	41
62	MER10	29	29	36	31	35	33	42
63	RIB1	34	34	47	48	48	46	55
64	RIB2	30	30	49	48	50	46	55
65	RIB3	34	34	47	42	46	42	49
66	RIB4	30	30	51	52	52	50	61
67	RIB5	34	34	43	44	46	44	51
68	RIB6	38	38	49	50	48	50	55
69	RIB7	34	34	47	46	48	44	55
70	RIB8	33	33	46	45	45	43	52
71	RIB9	39	39	42	43	45	41	50
72	RIB10	41	41	44	47	47	45	52
73	MON1	31	31	50	49	47	47	46
74	MON2	30	30	55	54	54	54	55
75	MON3	25	25	48	47	45	43	46
76	MON4	33	33	54	51	49	47	50
77	MON5	35	35	52	49	49	49	48
78	MON6	37	37	58	55	57	55	56
79	MON7	29	29	56	51	55	51	52
80	MON8	28	28	53	50	50	48	53
81	MON9	37	37	54	53	51	51	50
82	MON10	32	32	49	48	48	48	51
83	ITA1	31	31	46	49	47	47	46
84	ITA2	33	33	50	53	53	51	50
85	ITA3	33	33	48	51	49	49	50
86	ITA4	36	36	49	46	48	44	47
87	ITA5	37	37	50	51	51	53	52
88	ITA6	37	37	54	51	51	51	50
89	ITA7	35	35	48	49	49	47	48
90	ITA8	31	31	52	53	47	49	48
91	ITA9	34	34	51	50	50	50	47
92	ITA10	33	33	48	49	49	49	46
93	ACA1	46	46	49	48	46	48	49
94	ACA2	44	44	45	46	42	44	49
95	ACA3	46	46	43	40	40	40	45
96	ACA4	43	43	40	41	41	41	46
97	ACA5	49	49	48	47	45	47	48
98	ACA6	46	46	41	40	36	38	45
99	ACA7	48	48	45	46	44	44	49
100	ACA8	45	45	40	41	37	39	44
101	ACA9	43	43	42	41	39	41	46
102	ACA10	44	44	41	42	40	42	45

		8	9	10	11	12	13	14
1	<i>M.lateralis1</i>	0.47748	0.49550	0.43243	0.42342	0.40541	0.33333	0.28829
2	<i>M.lateralis2</i>	0.47748	0.49550	0.43243	0.42342	0.40541	0.33333	0.28829
3	PIR1	0.16216	0.16216	0.15315	0.10811	0.12613	0.30631	0.27928
4	PIR2	0.17117	0.13514	0.09009	0.09910	0.09910	0.31532	0.28829
5	PIR3	0.17117	0.15315	0.10811	0.08108	0.13514	0.29730	0.30631
6	PIR4	0.18919	0.18919	0.12613	0.11712	0.13514	0.29730	0.28829
7	PIR5	0.14414	0.18018	0.11712	0.18018	0.14414	0.32432	0.29730
8	PIR6	-	0.10811	0.13514	0.16216	0.14414	0.27027	0.36937
9	PIR7	12	-	0.13514	0.16216	0.14414	0.30631	0.35135
10	PIR8	15	15	-	0.09910	0.09910	0.29730	0.28829
11	PIR9	18	18	11	-	0.07207	0.25225	0.31532



12	PIR10	16	16	11	8	-	0.23423	0.29730
13	CAE1	30	34	33	28	26	-	0.18919
14	CAE2	41	39	32	35	33	21	-
15	CAE3	36	38	33	32	32	20	17
16	CAE4	28	32	29	32	32	22	17
17	CAE5	38	40	35	36	32	14	21
18	CAE6	32	28	35	34	34	24	23
19	CAE7	28	28	27	32	30	28	23
20	CAE8	33	33	22	31	27	21	18
21	CAE9	26	28	27	28	28	24	29
22	CAE10	32	32	29	32	32	28	29
23	PEQ1	33	31	28	29	29	31	30
24	PEQ2	32	34	31	32	32	30	31
25	PEQ3	35	31	34	35	33	33	32
26	PEQ4	33	31	32	29	29	25	28
27	PEQ5	35	33	34	27	31	31	32
28	PEQ6	30	26	25	26	26	28	35
29	PEQ7	27	23	26	27	25	37	38
30	PEQ8	26	30	27	24	30	32	37
31	PEQ9	27	33	28	29	31	37	34
32	PEQ10	29	29	28	29	29	29	34
33	VAR1	33	33	26	29	27	27	28
34	VAR2	32	30	25	28	22	26	23
35	VAR3	31	27	26	27	25	25	26
36	VAR4	31	31	28	31	27	31	30
37	VAR5	28	26	25	28	26	28	29
38	VAR6	31	29	26	29	27	25	30
39	VAR7	30	28	25	28	22	22	23
40	VAR8	30	30	27	30	26	18	21
41	VAR9	35	35	28	29	25	27	22
42	VAR10	32	34	29	32	30	24	23
43	AGU1	27	27	24	27	25	25	26
44	AGU2	25	29	24	23	23	25	26
45	AGU3	23	23	24	21	23	25	28
46	AGU4	24	26	25	22	24	24	33
47	AGU5	25	25	22	21	21	25	30
48	AGU6	21	23	20	25	23	29	30
49	AGU7	23	29	24	23	25	27	28
50	AGU8	23	21	24	23	25	27	30
51	AGU9	21	23	22	21	23	25	32
52	AGU10	23	23	20	19	21	27	32
53	MER1	42	40	41	38	34	32	29
54	MER2	44	44	43	40	38	36	31
55	MER3	52	48	45	42	44	42	35
56	MER4	42	42	41	36	34	32	29
57	MER5	44	42	39	34	34	34	29
58	MER6	40	34	35	32	26	30	29
59	MER7	45	41	40	39	35	39	36
60	MER8	44	40	43	36	32	34	35
61	MER9	39	37	38	31	31	33	34
62	MER10	44	38	35	32	34	36	31
63	RIB1	57	55	54	45	45	47	46
64	RIB2	57	53	52	45	43	47	46
65	RIB3	49	45	44	43	39	47	42
66	RIB4	57	53	54	47	47	47	48
67	RIB5	55	51	50	43	43	47	40
68	RIB6	51	49	50	49	47	49	48
69	RIB7	55	51	50	47	45	49	46
70	RIB8	50	46	45	44	42	46	45
71	RIB9	50	46	45	38	38	42	45
72	RIB10	52	48	47	42	42	42	43

73	MON1	52	54	47	48	44	42	37
74	MON2	53	53	50	49	43	41	38
75	MON3	50	54	47	44	42	38	39
76	MON4	52	52	47	46	44	44	45
77	MON5	50	50	45	46	42	44	45
78	MON6	54	56	53	54	48	48	49
79	MON7	52	54	51	50	44	42	43
80	MON8	53	55	50	45	41	39	40
81	MON9	52	54	53	50	46	44	47
82	MON10	47	49	48	41	37	37	44
83	ITA1	44	46	47	44	42	42	43
84	ITA2	48	52	51	50	44	44	41
85	ITA3	48	54	53	46	42	42	45
86	ITA4	47	51	50	47	43	43	44
87	ITA5	48	54	51	50	44	46	43
88	ITA6	48	52	53	48	46	40	45
89	ITA7	44	46	47	48	46	44	45
90	ITA8	46	48	47	48	44	44	47
91	ITA9	47	49	50	47	43	41	42
92	ITA10	44	46	47	48	42	42	41
93	ACA1	47	47	46	45	41	41	42
94	ACA2	47	45	44	41	39	37	40
95	ACA3	45	41	40	39	35	37	36
96	ACA4	44	42	43	40	38	40	39
97	ACA5	46	44	45	44	40	42	43
98	ACA6	43	39	38	35	33	39	38
99	ACA7	49	47	46	43	41	39	40
100	ACA8	42	40	39	36	34	38	41
101	ACA9	42	38	41	38	36	38	41
102	ACA10	41	41	42	39	37	39	42

		15	16	17	18	19	20	21
1	<i>M.lateralis1</i>	0.35135	0.40541	0.29730	0.45946	0.45946	0.30631	0.42342
2	<i>M.lateralis2</i>	0.35135	0.40541	0.29730	0.45946	0.45946	0.30631	0.42342
3	PIR1	0.25225	0.25225	0.36036	0.28829	0.25225	0.27928	0.23423
4	PIR2	0.27928	0.27928	0.36937	0.29730	0.24324	0.25225	0.26126
5	PIR3	0.27928	0.24324	0.33333	0.27928	0.26126	0.25225	0.26126
6	PIR4	0.26126	0.29730	0.33333	0.29730	0.29730	0.27027	0.24324
7	PIR5	0.27027	0.27027	0.34234	0.30631	0.27027	0.24324	0.23423
8	PIR6	0.32432	0.25225	0.34234	0.28829	0.25225	0.29730	0.23423
9	PIR7	0.34234	0.28829	0.36036	0.25225	0.25225	0.29730	0.25225
10	PIR8	0.29730	0.26126	0.31532	0.31532	0.24324	0.19820	0.24324
11	PIR9	0.28829	0.28829	0.32432	0.30631	0.28829	0.27928	0.25225
12	PIR10	0.28829	0.28829	0.28829	0.30631	0.27027	0.24324	0.25225
13	CAE1	0.18018	0.19820	0.12613	0.21622	0.25225	0.18919	0.21622
14	CAE2	0.15315	0.15315	0.18919	0.20721	0.20721	0.16216	0.26126
15	CAE3	-	0.16216	0.19820	0.19820	0.25225	0.20721	0.21622
16	CAE4	18	-	0.23423	0.12613	0.16216	0.17117	0.25225
17	CAE5	22	26	-	0.23423	0.27027	0.15315	0.25225
18	CAE6	22	14	26	-	0.14414	0.22523	0.21622
19	CAE7	28	18	30	16	-	0.20721	0.23423
20	CAE8	23	19	17	25	23	-	0.22523
21	CAE9	24	28	28	24	26	25	-
22	CAE10	30	26	30	24	18	21	14
23	PEQ1	31	29	29	27	25	28	29
24	PEQ2	28	26	34	26	34	31	32
25	PEQ3	29	31	27	29	35	26	35
26	PEQ4	27	27	29	27	29	32	33
27	PEQ5	25	25	33	25	31	32	35
28	PEQ6	34	30	36	26	24	31	26

29	PEQ7	35	31	37	25	25	34	27
30	PEQ8	34	32	36	28	30	35	26
31	PEQ9	27	27	35	23	27	34	25
32	PEQ10	29	27	33	27	23	28	29
33	VAR1	27	35	27	37	37	30	35
34	VAR2	28	34	26	38	36	25	30
35	VAR3	27	35	27	31	31	28	31
36	VAR4	33	37	29	39	35	32	29
37	VAR5	32	36	28	36	36	31	32
38	VAR6	31	39	27	39	37	32	31
39	VAR7	30	34	22	36	34	23	28
40	VAR8	26	30	20	34	34	21	30
41	VAR9	31	35	23	39	37	24	35
42	VAR10	28	32	22	38	38	27	34
43	AGU1	25	27	33	31	23	28	29
44	AGU2	23	25	35	31	29	32	27
45	AGU3	23	25	35	27	27	30	23
46	AGU4	30	30	36	36	30	33	30
47	AGU5	27	29	37	33	29	32	25
48	AGU6	27	25	37	33	27	30	29
49	AGU7	23	23	33	31	29	32	29
50	AGU8	31	27	35	27	27	32	29
51	AGU9	27	27	35	31	27	30	23
52	AGU10	27	27	35	29	27	32	25
53	MER1	32	34	30	40	38	31	42
54	MER2	34	38	36	44	42	33	44
55	MER3	38	44	40	50	46	35	50
56	MER4	30	34	34	40	42	31	40
57	MER5	28	36	32	40	40	29	40
58	MER6	32	36	30	40	40	31	40
59	MER7	37	39	37	45	41	36	47
60	MER8	36	36	38	40	42	39	44
61	MER9	33	35	37	39	39	34	37
62	MER10	34	38	34	46	42	31	44
63	RIB1	47	55	47	57	57	48	51
64	RIB2	47	55	47	57	57	50	51
65	RIB3	43	47	47	53	51	46	51
66	RIB4	47	55	49	57	55	48	53
67	RIB5	45	51	47	51	49	46	51
68	RIB6	47	49	49	55	51	46	55
69	RIB7	43	51	43	51	53	46	53
70	RIB8	42	48	44	54	50	45	52
71	RIB9	38	50	44	50	54	47	46
72	RIB10	40	48	44	50	52	43	50
73	MON1	44	46	36	48	48	33	48
74	MON2	47	45	35	49	49	34	55
75	MON3	36	46	36	48	52	35	44
76	MON4	48	54	40	60	56	39	52
77	MON5	50	50	40	56	54	35	54
78	MON6	52	54	44	58	56	43	56
79	MON7	46	50	40	54	54	39	52
80	MON8	45	49	37	53	55	36	51
81	MON9	52	52	44	56	54	41	54
82	MON10	47	47	39	51	53	38	49
83	ITA1	42	46	40	52	50	43	52
84	ITA2	38	44	44	52	52	41	54
85	ITA3	40	46	44	52	52	43	52
86	ITA4	41	43	45	49	51	42	51
87	ITA5	44	48	44	52	50	43	56
88	ITA6	42	46	44	52	54	41	54
89	ITA7	42	48	44	54	52	43	52

90	ITA8	46	50	40	56	50	41	52
91	ITA9	45	47	41	53	49	40	51
92	ITA10	44	44	40	52	50	37	54
93	ACA1	45	41	35	45	49	38	49
94	ACA2	39	37	31	41	45	36	45
95	ACA3	39	37	31	37	41	34	41
96	ACA4	40	40	34	42	46	39	44
97	ACA5	44	40	36	44	48	39	46
98	ACA6	41	37	33	39	41	36	43
99	ACA7	41	41	33	43	47	38	45
100	ACA8	40	38	32	42	44	37	44
101	ACA9	42	42	32	44	46	37	40
102	ACA10	39	39	33	43	47	38	43

		22	23	24	25	26	27	28
1	<i>M.lateralis1</i>	0.47748	0.41441	0.40541	0.36036	0.34234	0.41441	0.49550
2	<i>M.lateralis2</i>	0.47748	0.41441	0.40541	0.36036	0.34234	0.41441	0.49550
3	PIR1	0.27027	0.26126	0.32432	0.31532	0.24324	0.22523	0.23423
4	PIR2	0.29730	0.25225	0.27928	0.28829	0.27027	0.25225	0.22523
5	PIR3	0.29730	0.25225	0.29730	0.30631	0.23423	0.25225	0.24324
6	PIR4	0.31532	0.25225	0.31532	0.32432	0.23423	0.25225	0.27928
7	PIR5	0.25225	0.26126	0.30631	0.31532	0.31532	0.31532	0.30631
8	PIR6	0.28829	0.29730	0.28829	0.31532	0.29730	0.31532	0.27027
9	PIR7	0.28829	0.27928	0.30631	0.27928	0.27928	0.29730	0.23423
10	PIR8	0.26126	0.25225	0.27928	0.30631	0.28829	0.30631	0.22523
11	PIR9	0.28829	0.26126	0.28829	0.31532	0.26126	0.24324	0.23423
12	PIR10	0.28829	0.26126	0.28829	0.29730	0.26126	0.27928	0.23423
13	CAE1	0.25225	0.27928	0.27027	0.29730	0.22523	0.27928	0.25225
14	CAE2	0.26126	0.27027	0.27928	0.28829	0.25225	0.28829	0.31532
15	CAE3	0.27027	0.27928	0.25225	0.26126	0.24324	0.22523	0.30631
16	CAE4	0.23423	0.26126	0.23423	0.27928	0.24324	0.22523	0.27027
17	CAE5	0.27027	0.26126	0.30631	0.24324	0.26126	0.29730	0.32432
18	CAE6	0.21622	0.24324	0.23423	0.26126	0.24324	0.22523	0.23423
19	CAE7	0.16216	0.22523	0.30631	0.31532	0.26126	0.27928	0.21622
20	CAE8	0.18919	0.25225	0.27928	0.23423	0.28829	0.28829	0.27928
21	CAE9	0.12613	0.26126	0.28829	0.31532	0.29730	0.31532	0.23423
22	CAE10	-	0.26126	0.30631	0.31532	0.31532	0.29730	0.21622
23	PEQ1	29	-	0.18919	0.23423	0.14414	0.16216	0.18919
24	PEQ2	34	21	-	0.13514	0.17117	0.15315	0.21622
25	PEQ3	35	26	15	-	0.19820	0.19820	0.22523
26	PEQ4	35	16	19	22	-	0.12613	0.18919
27	PEQ5	33	18	17	22	14	-	0.17117
28	PEQ6	24	21	24	25	21	19	-
29	PEQ7	27	18	21	18	22	20	13
30	PEQ8	30	15	20	27	19	15	18
31	PEQ9	29	16	17	24	20	14	21
32	PEQ10	25	10	19	22	14	14	15
33	VAR1	41	26	21	24	24	30	31
34	VAR2	34	29	30	27	27	33	32
35	VAR3	35	22	25	26	22	28	31
36	VAR4	35	28	25	28	28	34	33
37	VAR5	38	21	20	21	21	27	28
38	VAR6	39	22	21	24	20	28	31
39	VAR7	32	25	26	23	25	31	30
40	VAR8	34	27	26	23	25	33	34
41	VAR9	39	28	27	24	28	34	35
42	VAR10	40	29	26	25	29	35	36
43	AGU1	27	24	27	28	24	32	23
44	AGU2	31	22	23	28	24	24	21
45	AGU3	29	28	27	30	24	28	21

46	AGU4	30	27	32	33	31	29	24
47	AGU5	33	24	29	34	24	26	21
48	AGU6	27	26	29	30	26	26	19
49	AGU7	31	22	27	30	18	22	21
50	AGU8	31	22	27	30	24	26	21
51	AGU9	31	24	29	34	24	26	21
52	AGU10	31	22	29	34	24	26	19
53	MER1	44	41	40	31	35	43	42
54	MER2	42	39	36	33	37	41	44
55	MER3	50	45	44	37	43	41	48
56	MER4	42	39	34	31	33	37	40
57	MER5	42	37	38	33	35	37	42
58	MER6	42	37	36	31	31	35	38
59	MER7	45	42	45	42	36	42	43
60	MER8	48	47	44	41	39	43	42
61	MER9	43	40	41	38	34	40	39
62	MER10	44	39	38	31	35	35	42
63	RIB1	53	46	45	42	38	44	51
64	RIB2	53	46	45	44	38	44	49
65	RIB3	55	46	41	40	36	42	43
66	RIB4	59	48	49	46	42	48	49
67	RIB5	51	44	47	46	40	44	49
68	RIB6	55	50	49	46	42	50	49
69	RIB7	57	48	49	44	40	44	49
70	RIB8	54	43	44	43	35	41	44
71	RIB9	52	47	44	43	39	41	40
72	RIB10	50	49	48	49	43	43	46
73	MON1	44	47	46	41	43	49	50
74	MON2	51	50	49	44	46	50	53
75	MON3	48	47	42	37	41	45	46
76	MON4	54	49	46	41	43	51	52
77	MON5	50	51	48	43	45	51	52
78	MON6	56	57	54	51	51	57	56
79	MON7	54	55	52	47	49	53	52
80	MON8	53	50	45	40	42	48	49
81	MON9	52	53	50	45	49	55	54
82	MON10	51	52	47	44	44	50	49
83	ITA1	52	47	50	47	39	49	56
84	ITA2	52	53	46	41	47	49	54
85	ITA3	52	51	46	45	45	49	56
86	ITA4	53	50	47	46	42	48	53
87	ITA5	56	47	46	45	45	47	50
88	ITA6	56	51	48	47	45	49	58
89	ITA7	56	47	48	45	41	47	54
90	ITA8	52	49	50	45	43	53	52
91	ITA9	53	52	51	46	46	54	59
92	ITA10	52	51	50	43	43	49	54
93	ACA1	45	50	41	36	48	48	47
94	ACA2	43	48	43	36	46	46	45
95	ACA3	39	44	41	34	44	44	39
96	ACA4	44	43	40	31	41	41	44
97	ACA5	42	51	44	37	49	49	46
98	ACA6	41	40	37	34	40	42	41
99	ACA7	43	46	43	36	46	44	45
100	ACA8	42	43	38	33	41	43	42
101	ACA9	42	43	40	33	39	45	46
102	ACA10	43	46	39	32	42	44	45

	29	30	31	32	33	34	35
1 <i>M.lateralis</i> 1	0.46847	0.45946	0.45045	0.45045	0.28829	0.26126	0.30631
2 <i>M.lateralis</i> 2	0.46847	0.45946	0.45045	0.45045	0.28829	0.26126	0.30631
3 PIR1	0.20721	0.21622	0.24324	0.24324	0.31532	0.25225	0.26126
4 PIR2	0.19820	0.24324	0.25225	0.25225	0.25225	0.22523	0.21622
5 PIR3	0.23423	0.22523	0.25225	0.25225	0.27027	0.26126	0.23423
6 PIR4	0.27027	0.22523	0.23423	0.28829	0.27027	0.22523	0.21622
7 PIR5	0.26126	0.25225	0.26126	0.26126	0.27928	0.25225	0.24324
8 PIR6	0.24324	0.23423	0.24324	0.26126	0.29730	0.28829	0.27928
9 PIR7	0.20721	0.27027	0.29730	0.26126	0.29730	0.27027	0.24324
10 PIR8	0.23423	0.24324	0.25225	0.25225	0.23423	0.22523	0.23423
11 PIR9	0.24324	0.21622	0.26126	0.26126	0.26126	0.25225	0.24324
12 PIR10	0.22523	0.27027	0.27928	0.26126	0.24324	0.19820	0.22523
13 CAE1	0.33333	0.28829	0.33333	0.26126	0.24324	0.23423	0.22523
14 CAE2	0.34234	0.33333	0.30631	0.30631	0.25225	0.20721	0.23423
15 CAE3	0.31532	0.30631	0.24324	0.26126	0.24324	0.25225	0.24324
16 CAE4	0.27928	0.28829	0.24324	0.24324	0.31532	0.30631	0.31532
17 CAE5	0.33333	0.32432	0.31532	0.29730	0.24324	0.23423	0.24324
18 CAE6	0.22523	0.25225	0.20721	0.24324	0.33333	0.34234	0.27928
19 CAE7	0.22523	0.27027	0.24324	0.20721	0.33333	0.32432	0.27928
20 CAE8	0.30631	0.31532	0.30631	0.25225	0.27027	0.22523	0.25225
21 CAE9	0.24324	0.23423	0.22523	0.26126	0.31532	0.27027	0.27928
22 CAE10	0.24324	0.27027	0.26126	0.22523	0.36937	0.30631	0.31532
23 PEQ1	0.16216	0.13514	0.14414	0.09009	0.23423	0.26126	0.19820
24 PEQ2	0.18919	0.18018	0.15315	0.17117	0.18919	0.27027	0.22523
25 PEQ3	0.16216	0.24324	0.21622	0.19820	0.21622	0.24324	0.23423
26 PEQ4	0.19820	0.17117	0.18018	0.12613	0.21622	0.24324	0.19820
27 PEQ5	0.18018	0.13514	0.12613	0.12613	0.27027	0.29730	0.25225
28 PEQ6	0.11712	0.16216	0.18919	0.13514	0.27928	0.28829	0.27928
29 PEQ7	-	0.17117	0.12613	0.16216	0.25225	0.26126	0.23423
30 PEQ8	19	-	0.11712	0.11712	0.29730	0.32432	0.26126
31 PEQ9	14	13	-	0.14414	0.25225	0.27928	0.23423
32 PEQ10	18	13	16	-	0.27027	0.27928	0.19820
33 VAR1	28	33	28	30	-	0.09910	0.12613
34 VAR2	29	36	31	31	11	-	0.09910
35 VAR3	26	29	26	22	14	11	-
36 VAR4	28	35	30	32	8	11	16
37 VAR5	23	26	23	23	9	12	11
38 VAR6	26	29	28	24	8	13	10
39 VAR7	27	32	31	27	11	4	11
40 VAR8	31	34	33	29	11	8	11
41 VAR9	32	35	34	32	8	9	16
42 VAR10	33	36	33	33	9	12	17
43 AGU1	28	29	28	20	24	25	28
44 AGU2	26	23	24	20	26	29	32
45 AGU3	30	27	26	24	26	25	30
46 AGU4	29	26	31	23	33	32	35
47 AGU5	28	25	28	20	30	29	32
48 AGU6	26	25	26	18	28	27	32
49 AGU7	26	23	20	18	28	29	30
50 AGU8	26	23	24	20	28	29	32
51 AGU9	28	23	26	20	30	29	32
52 AGU10	26	23	26	20	28	31	32
53 MER1	39	46	43	43	27	22	29
54 MER2	43	44	45	41	31	26	31
55 MER3	47	46	51	49	39	32	39
56 MER4	39	44	41	39	29	22	29
57 MER5	41	42	39	37	29	24	27
58 MER6	39	40	43	37	27	22	29
59 MER7	42	49	46	46	36	29	38
60 MER8	43	48	49	47	35	30	37

61	MER9	40	43	44	40	32	27	32
62	MER10	41	42	45	41	31	26	33
63	RIB1	48	51	48	50	34	33	40
64	RIB2	46	51	50	50	34	33	40
65	RIB3	42	51	46	48	30	29	40
66	RIB4	48	53	54	52	40	39	46
67	RIB5	48	53	52	50	38	35	44
68	RIB6	48	57	52	54	38	37	48
69	RIB7	46	51	50	52	40	39	46
70	RIB8	43	50	47	47	33	32	41
71	RIB9	43	48	49	49	35	34	43
72	RIB10	49	52	53	51	43	40	47
73	MON1	49	48	51	49	43	38	43
74	MON2	54	53	56	52	46	41	46
75	MON3	47	48	49	49	41	38	43
76	MON4	51	50	55	51	43	40	45
77	MON5	53	50	57	51	47	42	49
78	MON6	55	58	59	61	53	50	55
79	MON7	53	56	57	59	47	44	51
80	MON8	50	51	54	52	42	37	44
81	MON9	55	52	59	55	49	44	51
82	MON10	50	49	56	52	46	41	48
83	ITA1	53	50	51	49	43	38	43
84	ITA2	53	54	51	51	43	38	45
85	ITA3	53	52	53	49	47	42	43
86	ITA4	52	51	50	52	46	41	46
87	ITA5	49	52	49	51	43	42	49
88	ITA6	59	54	57	51	47	46	47
89	ITA7	53	48	51	49	45	44	49
90	ITA8	51	52	53	51	43	42	45
91	ITA9	58	53	60	52	48	43	46
92	ITA10	55	52	55	51	45	38	49
93	ACA1	46	45	52	48	44	41	46
94	ACA2	44	45	50	46	42	39	42
95	ACA3	40	43	46	46	38	35	40
96	ACA4	39	40	47	43	39	36	41
97	ACA5	45	48	51	49	43	40	45
98	ACA6	40	41	44	40	40	37	36
99	ACA7	44	43	50	46	44	41	44
100	ACA8	39	40	45	41	41	38	39
101	ACA9	41	42	49	43	39	36	37
102	ACA10	40	41	48	44	38	35	38

		36	37	38	39	40	41	42
1	<i>M.lateralis1</i>	0.30631	0.31532	0.30631	0.26126	0.24324	0.23423	0.26126
2	<i>M.lateralis2</i>	0.30631	0.31532	0.30631	0.26126	0.24324	0.23423	0.26126
3	PIR1	0.31532	0.28829	0.29730	0.27027	0.30631	0.29730	0.34234
4	PIR2	0.27027	0.22523	0.25225	0.22523	0.24324	0.25225	0.27928
5	PIR3	0.28829	0.24324	0.27027	0.26126	0.27928	0.27027	0.29730
6	PIR4	0.27027	0.24324	0.25225	0.24324	0.26126	0.27027	0.29730
7	PIR5	0.29730	0.25225	0.27928	0.25225	0.27027	0.27928	0.30631
8	PIR6	0.27928	0.25225	0.27928	0.27027	0.27027	0.31532	0.28829
9	PIR7	0.27928	0.23423	0.26126	0.25225	0.27027	0.31532	0.30631
10	PIR8	0.25225	0.22523	0.23423	0.22523	0.24324	0.25225	0.26126
11	PIR9	0.27928	0.25225	0.26126	0.25225	0.27027	0.26126	0.28829
12	PIR10	0.24324	0.23423	0.24324	0.19820	0.23423	0.22523	0.27027
13	CAE1	0.27928	0.25225	0.22523	0.19820	0.16216	0.24324	0.21622
14	CAE2	0.27027	0.26126	0.27027	0.20721	0.18919	0.19820	0.20721
15	CAE3	0.29730	0.28829	0.27928	0.27027	0.23423	0.27928	0.25225
16	CAE4	0.33333	0.32432	0.35135	0.30631	0.27027	0.31532	0.28829

17 CAE5	0.26126	0.25225	0.24324	0.19820	0.18018	0.20721	0.19820
18 CAE6	0.35135	0.32432	0.35135	0.32432	0.30631	0.35135	0.34234
19 CAE7	0.31532	0.32432	0.33333	0.30631	0.30631	0.33333	0.34234
20 CAE8	0.28829	0.27928	0.28829	0.20721	0.18919	0.21622	0.24324
21 CAE9	0.26126	0.28829	0.27928	0.25225	0.27027	0.31532	0.30631
22 CAE10	0.31532	0.34234	0.35135	0.28829	0.30631	0.35135	0.36036
23 PEQ1	0.25225	0.18919	0.19820	0.22523	0.24324	0.25225	0.26126
24 PEQ2	0.22523	0.18018	0.18919	0.23423	0.23423	0.24324	0.23423
25 PEQ3	0.25225	0.18919	0.21622	0.20721	0.20721	0.21622	0.22523
26 PEQ4	0.25225	0.18919	0.18018	0.22523	0.22523	0.25225	0.26126
27 PEQ5	0.30631	0.24324	0.25225	0.27928	0.29730	0.30631	0.31532
28 PEQ6	0.29730	0.25225	0.27928	0.27027	0.30631	0.31532	0.32432
29 PEQ7	0.25225	0.20721	0.23423	0.24324	0.27928	0.28829	0.29730
30 PEQ8	0.31532	0.23423	0.26126	0.28829	0.30631	0.31532	0.32432
31 PEQ9	0.27027	0.20721	0.25225	0.27928	0.29730	0.30631	0.29730
32 PEQ10	0.28829	0.20721	0.21622	0.24324	0.26126	0.28829	0.29730
33 VAR1	0.07207	0.08108	0.07207	0.09910	0.09910	0.07207	0.08108
34 VAR2	0.09910	0.10811	0.11712	0.03604	0.07207	0.08108	0.10811
35 VAR3	0.14414	0.09910	0.09009	0.09910	0.09910	0.14414	0.15315
36 VAR4	-	0.08108	0.09009	0.09910	0.11712	0.10811	0.08108
37 VAR5	9	-	0.08108	0.07207	0.09009	0.09910	0.09009
38 VAR6	10	9	-	0.08108	0.09910	0.12613	0.11712
39 VAR7	11	8	9	-	0.03604	0.06306	0.09009
40 VAR8	13	10	11	4	-	0.08108	0.05405
41 VAR9	12	11	14	7	9	-	0.06306
42 VAR10	9	10	13	10	6	7	-
43 AGU1	28	27	24	23	23	26	25
44 AGU2	28	25	26	25	27	26	25
45 AGU3	26	27	26	25	27	28	27
46 AGU4	33	32	29	30	30	33	30
47 AGU5	30	29	26	27	29	30	29
48 AGU6	28	29	28	27	27	30	27
49 AGU7	30	27	28	29	29	30	27
50 AGU8	28	25	28	27	29	28	27
51 AGU9	30	29	26	27	29	30	29
52 AGU10	28	29	28	29	31	30	29
53 MER1	29	30	33	24	22	21	24
54 MER2	33	32	35	26	24	25	26
55 MER3	39	40	41	34	32	31	32
56 MER4	29	30	33	24	22	23	22
57 MER5	31	32	33	26	24	25	26
58 MER6	29	28	31	22	22	21	24
59 MER7	36	39	42	33	33	32	33
60 MER8	37	38	41	32	32	31	34
61 MER9	34	35	36	29	29	28	31
62 MER10	35	32	33	26	26	25	28
63 RIB1	38	39	38	35	37	32	39
64 RIB2	38	39	38	35	37	34	39
65 RIB3	32	35	36	33	35	32	33
66 RIB4	40	43	42	41	41	38	39
67 RIB5	40	43	40	37	39	34	37
68 RIB6	40	43	44	41	43	38	41
69 RIB7	44	45	44	41	43	38	45
70 RIB8	35	38	37	36	38	35	36
71 RIB9	37	40	39	38	40	37	38
72 RIB10	45	46	45	42	44	41	42
73 MON1	41	42	45	38	36	35	36
74 MON2	46	47	50	41	39	38	39
75 MON3	41	42	43	38	36	35	34
76 MON4	43	42	43	40	40	37	38
77 MON5	47	46	49	42	42	39	42



78	MON6	51	52	55	50	48	47	46
79	MON7	47	48	51	44	42	41	40
80	MON8	42	43	46	37	35	34	35
81	MON9	49	48	51	44	44	41	44
82	MON10	46	45	48	41	41	38	41
83	ITA1	45	44	45	42	40	39	40
84	ITA2	43	46	49	42	40	39	38
85	ITA3	45	48	49	44	42	41	42
86	ITA4	46	47	50	45	41	42	41
87	ITA5	45	44	49	42	42	37	38
88	ITA6	49	48	49	46	42	43	42
89	ITA7	47	44	45	46	44	43	42
90	ITA8	41	44	45	44	42	41	40
91	ITA9	46	47	48	43	41	40	41
92	ITA10	47	46	49	40	40	37	40
93	ACA1	46	45	48	39	37	38	39
94	ACA2	44	45	46	39	37	38	39
95	ACA3	40	41	44	35	33	34	35
96	ACA4	43	40	41	34	34	33	36
97	ACA5	45	46	49	40	38	39	40
98	ACA6	42	41	40	37	37	36	39
99	ACA7	46	45	46	39	37	38	39
100	ACA8	43	42	41	38	38	37	40
101	ACA9	39	38	39	34	32	33	34
102	ACA10	40	41	42	35	33	34	35

		43	44	45	46	47	48	49
1	<i>M.lateralis1</i>	0.39640	0.41441	0.39640	0.42342	0.41441	0.43243	0.39640
2	<i>M.lateralis2</i>	0.39640	0.41441	0.39640	0.42342	0.41441	0.43243	0.39640
3	PIR1	0.26126	0.22523	0.22523	0.25225	0.22523	0.22523	0.20721
4	PIR2	0.23423	0.19820	0.21622	0.26126	0.19820	0.21622	0.25225
5	PIR3	0.27027	0.23423	0.21622	0.26126	0.23423	0.25225	0.21622
6	PIR4	0.27027	0.23423	0.19820	0.24324	0.19820	0.23423	0.23423
7	PIR5	0.26126	0.24324	0.27928	0.28829	0.27928	0.26126	0.27928
8	PIR6	0.24324	0.22523	0.20721	0.21622	0.22523	0.18919	0.20721
9	PIR7	0.24324	0.26126	0.20721	0.23423	0.22523	0.20721	0.26126
10	PIR8	0.21622	0.21622	0.21622	0.22523	0.19820	0.18018	0.21622
11	PIR9	0.24324	0.20721	0.18919	0.19820	0.18919	0.22523	0.20721
12	PIR10	0.22523	0.20721	0.20721	0.21622	0.18919	0.20721	0.22523
13	CAE1	0.22523	0.22523	0.22523	0.21622	0.22523	0.26126	0.24324
14	CAE2	0.23423	0.23423	0.25225	0.29730	0.27027	0.27027	0.25225
15	CAE3	0.22523	0.20721	0.20721	0.27027	0.24324	0.24324	0.20721
16	CAE4	0.24324	0.22523	0.22523	0.27027	0.26126	0.22523	0.20721
17	CAE5	0.29730	0.31532	0.31532	0.32432	0.33333	0.33333	0.29730
18	CAE6	0.27928	0.27928	0.24324	0.32432	0.29730	0.29730	0.27928
19	CAE7	0.20721	0.26126	0.24324	0.27027	0.26126	0.24324	0.26126
20	CAE8	0.25225	0.28829	0.27027	0.29730	0.28829	0.27027	0.28829
21	CAE9	0.26126	0.24324	0.20721	0.27027	0.22523	0.26126	0.26126
22	CAE10	0.24324	0.27928	0.26126	0.27027	0.29730	0.24324	0.27928
23	PEQ1	0.21622	0.19820	0.25225	0.24324	0.21622	0.23423	0.19820
24	PEQ2	0.24324	0.20721	0.24324	0.28829	0.26126	0.26126	0.24324
25	PEQ3	0.25225	0.25225	0.27027	0.29730	0.30631	0.27027	0.27027
26	PEQ4	0.21622	0.21622	0.21622	0.27928	0.21622	0.23423	0.16216
27	PEQ5	0.28829	0.21622	0.25225	0.26126	0.23423	0.23423	0.19820
28	PEQ6	0.20721	0.18919	0.18919	0.21622	0.18919	0.17117	0.18919
29	PEQ7	0.25225	0.23423	0.27027	0.26126	0.25225	0.23423	0.23423
30	PEQ8	0.26126	0.20721	0.24324	0.23423	0.22523	0.22523	0.20721
31	PEQ9	0.25225	0.21622	0.23423	0.27928	0.25225	0.23423	0.18018
32	PEQ10	0.18018	0.18018	0.21622	0.20721	0.18018	0.16216	0.16216
33	VAR1	0.21622	0.23423	0.23423	0.29730	0.27027	0.25225	0.25225

34	VAR2	0.22523	0.26126	0.22523	0.28829	0.26126	0.24324	0.26126
35	VAR3	0.25225	0.28829	0.27027	0.31532	0.28829	0.28829	0.27027
36	VAR4	0.25225	0.25225	0.23423	0.29730	0.27027	0.25225	0.27027
37	VAR5	0.24324	0.22523	0.24324	0.28829	0.26126	0.26126	0.24324
38	VAR6	0.21622	0.23423	0.23423	0.26126	0.23423	0.25225	0.25225
39	VAR7	0.20721	0.22523	0.22523	0.27027	0.24324	0.24324	0.26126
40	VAR8	0.20721	0.24324	0.24324	0.27027	0.26126	0.24324	0.26126
41	VAR9	0.23423	0.23423	0.25225	0.29730	0.27027	0.27027	0.27027
42	VAR10	0.22523	0.22523	0.24324	0.27027	0.26126	0.24324	0.24324
43	AGU1	-	0.09009	0.09009	0.11712	0.10811	0.09009	0.10811
44	AGU2	10	-	0.09009	0.11712	0.07207	0.10811	0.10811
45	AGU3	10	10	-	0.11712	0.07207	0.09009	0.10811
46	AGU4	13	13	13	-	0.06306	0.08108	0.13514
47	AGU5	12	8	8	7	-	0.07207	0.10811
48	AGU6	10	12	10	9	8	-	0.07207
49	AGU7	12	12	12	15	12	8	-
50	AGU8	14	10	8	9	8	10	12
51	AGU9	14	10	6	9	4	10	12
52	AGU10	12	8	8	11	4	8	10
53	MER1	33	37	31	38	39	37	37
54	MER2	37	39	35	38	41	39	41
55	MER3	43	43	43	42	43	45	47
56	MER4	37	35	31	38	37	37	37
57	MER5	33	37	31	36	35	35	35
58	MER6	31	31	29	34	31	31	35
59	MER7	34	38	34	41	38	38	38
60	MER8	39	39	33	42	39	41	43
61	MER9	34	36	28	37	34	36	34
62	MER10	37	39	37	36	37	37	39
63	RIB1	44	48	44	51	48	50	46
64	RIB2	44	48	44	49	46	48	46
65	RIB3	40	42	38	47	42	42	42
66	RIB4	44	48	42	45	44	50	48
67	RIB5	40	42	40	45	42	46	42
68	RIB6	42	46	40	49	48	48	46
69	RIB7	46	46	44	51	46	48	46
70	RIB8	39	43	39	44	41	43	41
71	RIB9	45	43	39	44	43	45	45
72	RIB10	47	43	41	44	43	47	47
73	MON1	49	47	49	52	53	51	51
74	MON2	50	52	52	53	54	52	52
75	MON3	45	41	43	46	45	49	45
76	MON4	47	49	49	48	49	51	49
77	MON5	51	51	51	52	53	51	53
78	MON6	57	55	57	60	59	59	57
79	MON7	51	49	51	54	53	55	53
80	MON8	46	46	46	49	48	50	48
81	MON9	53	51	51	54	57	57	57
82	MON10	50	48	46	49	50	52	52
83	ITA1	45	49	45	50	49	47	43
84	ITA2	43	45	43	48	49	45	45
85	ITA3	47	47	47	52	51	51	47
86	ITA4	48	46	44	53	50	50	48
87	ITA5	47	43	47	52	49	49	45
88	ITA6	51	49	49	54	51	55	51
89	ITA7	49	47	47	50	49	49	47
90	ITA8	47	51	49	52	53	51	47
91	ITA9	50	50	50	53	52	54	52
92	ITA10	47	47	45	50	49	47	47
93	ACA1	46	46	46	45	50	44	48
94	ACA2	42	44	42	41	46	42	44

95	ACA3	42	42	40	43	46	40	44
96	ACA4	43	41	43	42	45	41	43
97	ACA5	45	47	45	46	51	43	47
98	ACA6	42	44	40	41	44	40	42
99	ACA7	46	44	46	43	48	44	46
100	ACA8	39	41	39	38	43	39	41
101	ACA9	45	45	43	44	45	43	45
102	ACA10	42	44	42	43	46	40	42

		50	51	52	53	54	55	56
1	<i>M.lateralis1</i>	0.41441	0.41441	0.43243	0.17117	0.24324	0.27928	0.22523
2	<i>M.lateralis2</i>	0.41441	0.41441	0.43243	0.17117	0.24324	0.27928	0.22523
3	PIR1	0.24324	0.18919	0.22523	0.36036	0.37838	0.39640	0.34234
4	PIR2	0.25225	0.21622	0.19820	0.35135	0.36937	0.35135	0.33333
5	PIR3	0.23423	0.19820	0.19820	0.35135	0.36937	0.38739	0.33333
6	PIR4	0.25225	0.21622	0.19820	0.35135	0.36937	0.35135	0.33333
7	PIR5	0.29730	0.27928	0.27928	0.39640	0.39640	0.43243	0.39640
8	PIR6	0.20721	0.18919	0.20721	0.37838	0.39640	0.46847	0.37838
9	PIR7	0.18919	0.20721	0.20721	0.36036	0.39640	0.43243	0.37838
10	PIR8	0.21622	0.19820	0.18018	0.36937	0.38739	0.40541	0.36937
11	PIR9	0.20721	0.18919	0.17117	0.34234	0.36036	0.37838	0.32432
12	PIR10	0.22523	0.20721	0.18919	0.30631	0.34234	0.39640	0.30631
13	CAE1	0.24324	0.22523	0.24324	0.28829	0.32432	0.37838	0.28829
14	CAE2	0.27027	0.28829	0.28829	0.26126	0.27928	0.31532	0.26126
15	CAE3	0.27928	0.24324	0.24324	0.28829	0.30631	0.34234	0.27027
16	CAE4	0.24324	0.24324	0.24324	0.30631	0.34234	0.39640	0.30631
17	CAE5	0.31532	0.31532	0.31532	0.27027	0.32432	0.36036	0.30631
18	CAE6	0.24324	0.27928	0.26126	0.36036	0.39640	0.45045	0.36036
19	CAE7	0.24324	0.24324	0.24324	0.34234	0.37838	0.41441	0.37838
20	CAE8	0.28829	0.27027	0.28829	0.27928	0.29730	0.31532	0.27928
21	CAE9	0.26126	0.20721	0.22523	0.37838	0.39640	0.45045	0.36036
22	CAE10	0.27928	0.27928	0.27928	0.39640	0.37838	0.45045	0.37838
23	PEQ1	0.19820	0.21622	0.19820	0.36937	0.35135	0.40541	0.35135
24	PEQ2	0.24324	0.26126	0.26126	0.36036	0.32432	0.39640	0.30631
25	PEQ3	0.27027	0.30631	0.30631	0.27928	0.29730	0.33333	0.27928
26	PEQ4	0.21622	0.21622	0.21622	0.31532	0.33333	0.38739	0.29730
27	PEQ5	0.23423	0.23423	0.23423	0.38739	0.36937	0.36937	0.33333
28	PEQ6	0.18919	0.18919	0.17117	0.37838	0.39640	0.43243	0.36036
29	PEQ7	0.23423	0.25225	0.23423	0.35135	0.38739	0.42342	0.35135
30	PEQ8	0.20721	0.20721	0.20721	0.41441	0.39640	0.41441	0.39640
31	PEQ9	0.21622	0.23423	0.23423	0.38739	0.40541	0.45946	0.36937
32	PEQ10	0.18018	0.18018	0.18018	0.38739	0.36937	0.44144	0.35135
33	VAR1	0.25225	0.27027	0.25225	0.24324	0.27928	0.35135	0.26126
34	VAR2	0.26126	0.26126	0.27928	0.19820	0.23423	0.28829	0.19820
35	VAR3	0.28829	0.28829	0.28829	0.26126	0.27928	0.35135	0.26126
36	VAR4	0.25225	0.27027	0.25225	0.26126	0.29730	0.35135	0.26126
37	VAR5	0.22523	0.26126	0.26126	0.27027	0.28829	0.36036	0.27027
38	VAR6	0.25225	0.23423	0.25225	0.29730	0.31532	0.36937	0.29730
39	VAR7	0.24324	0.24324	0.26126	0.21622	0.23423	0.30631	0.21622
40	VAR8	0.26126	0.26126	0.27928	0.19820	0.21622	0.28829	0.19820
41	VAR9	0.25225	0.27027	0.27027	0.18919	0.22523	0.27928	0.20721
42	VAR10	0.24324	0.26126	0.26126	0.21622	0.23423	0.28829	0.19820
43	AGU1	0.12613	0.12613	0.10811	0.29730	0.33333	0.38739	0.33333
44	AGU2	0.09009	0.09009	0.07207	0.33333	0.35135	0.38739	0.31532
45	AGU3	0.07207	0.05405	0.07207	0.27928	0.31532	0.38739	0.27928
46	AGU4	0.08108	0.08108	0.09910	0.34234	0.34234	0.37838	0.34234
47	AGU5	0.07207	0.03604	0.03604	0.35135	0.36937	0.38739	0.33333
48	AGU6	0.09009	0.09009	0.07207	0.33333	0.35135	0.40541	0.33333
49	AGU7	0.10811	0.10811	0.09009	0.33333	0.36937	0.42342	0.33333
50	AGU8	-	0.05405	0.07207	0.31532	0.33333	0.40541	0.31532

51	AGU9	6	-	0.05405	0.33333	0.35135	0.40541	0.31532
52	AGU10	8	6	-	0.35135	0.38739	0.40541	0.35135
53	MER1	35	37	39	-	0.10811	0.18018	0.10811
54	MER2	37	39	43	12	-	0.14414	0.09009
55	MER3	45	45	45	20	16	-	0.16216
56	MER4	35	35	39	12	10	18	-
57	MER5	35	35	35	10	14	18	14
58	MER6	31	33	33	14	14	22	14
59	MER7	38	38	36	19	21	21	19
60	MER8	39	39	39	16	20	24	18
61	MER9	34	32	34	15	19	27	17
62	MER10	39	39	39	18	16	12	18
63	RIB1	50	48	48	29	31	31	31
64	RIB2	50	48	46	25	25	31	27
65	RIB3	44	44	42	23	27	29	23
66	RIB4	46	44	46	23	27	27	25
67	RIB5	44	42	44	31	31	29	29
68	RIB6	44	44	46	27	31	33	31
69	RIB7	48	46	44	27	33	31	33
70	RIB8	43	41	39	28	32	30	28
71	RIB9	45	43	43	30	34	32	26
72	RIB10	43	41	43	34	32	30	26
73	MON1	49	51	51	34	38	32	34
74	MON2	52	54	52	31	37	33	33
75	MON3	47	45	45	28	32	26	26
76	MON4	51	51	49	36	40	30	38
77	MON5	51	53	51	38	40	32	38
78	MON6	59	59	57	40	46	36	42
79	MON7	55	55	53	34	40	32	36
80	MON8	50	50	48	29	33	31	29
81	MON9	53	55	57	34	38	34	36
82	MON10	50	50	50	29	35	31	29
83	ITA1	47	47	47	26	36	30	32
84	ITA2	47	49	49	24	30	28	26
85	ITA3	53	51	49	28	34	30	28
86	ITA4	50	50	50	31	37	29	33
87	ITA5	47	47	47	32	38	34	32
88	ITA6	53	51	51	34	36	32	32
89	ITA7	47	47	49	34	40	34	38
90	ITA8	51	51	49	30	38	32	34
91	ITA9	52	52	52	29	31	29	35
92	ITA10	45	47	49	28	32	30	32
93	ACA1	46	48	48	33	35	41	35
94	ACA2	44	44	42	31	39	41	35
95	ACA3	42	44	42	31	35	39	31
96	ACA4	43	43	43	32	34	36	32
97	ACA5	47	49	47	32	38	42	34
98	ACA6	42	42	40	35	37	43	33
99	ACA7	46	46	46	37	39	39	33
100	ACA8	41	41	39	34	40	40	34
101	ACA9	43	43	43	30	32	36	30
102	ACA10	44	44	42	29	31	35	31

		57	58	59	60	61	62	63
1	<i>M.lateralis1</i>	0.20721	0.22523	0.28829	0.29730	0.23423	0.26126	0.30631
2	<i>M.lateralis2</i>	0.20721	0.22523	0.28829	0.29730	0.23423	0.26126	0.30631
3	PIR1	0.32432	0.32432	0.36937	0.36036	0.29730	0.32432	0.42342
4	PIR2	0.31532	0.29730	0.34234	0.35135	0.30631	0.27928	0.43243
5	PIR3	0.31532	0.33333	0.36036	0.38739	0.28829	0.31532	0.43243
6	PIR4	0.29730	0.29730	0.34234	0.36937	0.28829	0.29730	0.41441

7	PIR5	0.37838	0.36036	0.40541	0.43243	0.36937	0.37838	0.49550
8	PIR6	0.39640	0.36036	0.40541	0.39640	0.35135	0.39640	0.51351
9	PIR7	0.37838	0.30631	0.36937	0.36036	0.33333	0.34234	0.49550
10	PIR8	0.35135	0.31532	0.36036	0.38739	0.34234	0.31532	0.48649
11	PIR9	0.30631	0.28829	0.35135	0.32432	0.27928	0.28829	0.40541
12	PIR10	0.30631	0.23423	0.31532	0.28829	0.27928	0.30631	0.40541
13	CAE1	0.30631	0.27027	0.35135	0.30631	0.29730	0.32432	0.42342
14	CAE2	0.26126	0.26126	0.32432	0.31532	0.30631	0.27928	0.41441
15	CAE3	0.25225	0.28829	0.33333	0.32432	0.29730	0.30631	0.42342
16	CAE4	0.32432	0.32432	0.35135	0.32432	0.31532	0.34234	0.49550
17	CAE5	0.28829	0.27027	0.33333	0.34234	0.33333	0.30631	0.42342
18	CAE6	0.36036	0.36036	0.40541	0.36036	0.35135	0.41441	0.51351
19	CAE7	0.36036	0.36036	0.36937	0.37838	0.35135	0.37838	0.51351
20	CAE8	0.26126	0.27928	0.32432	0.35135	0.30631	0.27928	0.43243
21	CAE9	0.36036	0.36036	0.42342	0.39640	0.33333	0.39640	0.45946
22	CAE10	0.37838	0.37838	0.40541	0.43243	0.38739	0.39640	0.47748
23	PEQ1	0.33333	0.33333	0.37838	0.42342	0.36036	0.35135	0.41441
24	PEQ2	0.34234	0.32432	0.40541	0.39640	0.36937	0.34234	0.40541
25	PEQ3	0.29730	0.27928	0.37838	0.36937	0.34234	0.27928	0.37838
26	PEQ4	0.31532	0.27928	0.32432	0.35135	0.30631	0.31532	0.34234
27	PEQ5	0.33333	0.31532	0.37838	0.38739	0.36036	0.31532	0.39640
28	PEQ6	0.37838	0.34234	0.38739	0.37838	0.35135	0.37838	0.45946
29	PEQ7	0.36937	0.35135	0.37838	0.38739	0.36036	0.36937	0.43243
30	PEQ8	0.37838	0.36036	0.44144	0.43243	0.38739	0.37838	0.45946
31	PEQ9	0.35135	0.38739	0.41441	0.44144	0.39640	0.40541	0.43243
32	PEQ10	0.33333	0.33333	0.41441	0.42342	0.36036	0.36937	0.45045
33	VAR1	0.26126	0.24324	0.32432	0.31532	0.28829	0.27928	0.30631
34	VAR2	0.21622	0.19820	0.26126	0.27027	0.24324	0.23423	0.29730
35	VAR3	0.24324	0.26126	0.34234	0.33333	0.28829	0.29730	0.36036
36	VAR4	0.27928	0.26126	0.32432	0.33333	0.30631	0.31532	0.34234
37	VAR5	0.28829	0.25225	0.35135	0.34234	0.31532	0.28829	0.35135
38	VAR6	0.29730	0.27928	0.37838	0.36937	0.32432	0.29730	0.34234
39	VAR7	0.23423	0.19820	0.29730	0.28829	0.26126	0.23423	0.31532
40	VAR8	0.21622	0.19820	0.29730	0.28829	0.26126	0.23423	0.33333
41	VAR9	0.22523	0.18919	0.28829	0.27928	0.25225	0.22523	0.28829
42	VAR10	0.23423	0.21622	0.29730	0.30631	0.27928	0.25225	0.35135
43	AGU1	0.29730	0.27928	0.30631	0.35135	0.30631	0.33333	0.39640
44	AGU2	0.33333	0.27928	0.34234	0.35135	0.32432	0.35135	0.43243
45	AGU3	0.27928	0.26126	0.30631	0.29730	0.25225	0.33333	0.39640
46	AGU4	0.32432	0.30631	0.36937	0.37838	0.33333	0.32432	0.45946
47	AGU5	0.31532	0.27928	0.34234	0.35135	0.30631	0.33333	0.43243
48	AGU6	0.31532	0.27928	0.34234	0.36937	0.32432	0.33333	0.45045
49	AGU7	0.31532	0.31532	0.34234	0.38739	0.30631	0.35135	0.41441
50	AGU8	0.31532	0.27928	0.34234	0.35135	0.30631	0.35135	0.45045
51	AGU9	0.31532	0.29730	0.34234	0.35135	0.28829	0.35135	0.43243
52	AGU10	0.31532	0.29730	0.32432	0.35135	0.30631	0.35135	0.43243
53	MER1	0.09009	0.12613	0.17117	0.14414	0.13514	0.16216	0.26126
54	MER2	0.12613	0.12613	0.18919	0.18018	0.17117	0.14414	0.27928
55	MER3	0.16216	0.19820	0.18919	0.21622	0.24324	0.10811	0.27928
56	MER4	0.12613	0.12613	0.17117	0.16216	0.15315	0.16216	0.27928
57	MER5	-	0.16216	0.20721	0.16216	0.13514	0.12613	0.26126
58	MER6	18	-	0.15315	0.14414	0.11712	0.16216	0.26126
59	MER7	23	17	-	0.15315	0.16216	0.18919	0.21622
60	MER8	18	16	17	-	0.15315	0.18018	0.22523
61	MER9	15	13	18	17	-	0.17117	0.23423
62	MER10	14	18	21	20	19	-	0.22523
63	RIB1	29	29	24	25	26	25	-
64	RIB2	27	25	20	23	22	23	10
65	RIB3	27	23	16	19	20	23	20
66	RIB4	27	27	22	23	22	27	18
67	RIB5	29	29	24	25	22	25	20

68	RIB6	33	31	18	27	26	29	16
69	RIB7	31	29	22	27	24	29	20
70	RIB8	30	26	17	26	25	24	19
71	RIB9	30	28	31	24	25	26	25
72	RIB10	32	30	25	22	31	30	27
73	MON1	34	38	37	36	39	38	45
74	MON2	35	33	34	33	38	35	46
75	MON3	28	34	31	34	33	32	41
76	MON4	38	36	35	40	37	34	39
77	MON5	38	36	35	36	39	34	43
78	MON6	44	42	37	38	45	44	49
79	MON7	38	34	33	34	39	38	43
80	MON8	31	29	30	29	36	35	38
81	MON9	40	38	39	36	39	40	41
82	MON10	33	33	34	27	36	33	42
83	ITA1	30	34	29	28	35	32	35
84	ITA2	26	30	27	26	33	34	33
85	ITA3	28	34	29	28	33	36	35
86	ITA4	35	33	30	31	34	37	38
87	ITA5	36	38	33	34	41	40	39
88	ITA6	34	36	35	34	37	36	39
89	ITA7	36	38	39	36	39	36	45
90	ITA8	32	34	31	34	37	38	41
91	ITA9	29	31	32	25	32	31	38
92	ITA10	30	28	27	28	33	28	37
93	ACA1	35	33	40	35	36	37	48
94	ACA2	33	33	38	35	34	37	46
95	ACA3	33	29	36	33	34	37	48
96	ACA4	34	30	37	36	33	32	45
97	ACA5	34	34	37	32	35	36	45
98	ACA6	33	33	40	37	36	37	48
99	ACA7	37	33	40	35	38	37	46
100	ACA8	34	34	37	36	39	36	47
101	ACA9	32	28	35	34	33	32	43
102	ACA10	29	29	34	33	32	33	44

		64	65	66	67	68	69	70
1	<i>M.lateralis1</i>	0.27027	0.30631	0.27027	0.30631	0.34234	0.30631	0.29730
2	<i>M.lateralis2</i>	0.27027	0.30631	0.27027	0.30631	0.34234	0.30631	0.29730
3	PIR1	0.44144	0.42342	0.45946	0.38739	0.44144	0.42342	0.41441
4	PIR2	0.43243	0.37838	0.46847	0.39640	0.45045	0.41441	0.40541
5	PIR3	0.45045	0.41441	0.46847	0.41441	0.43243	0.43243	0.40541
6	PIR4	0.41441	0.37838	0.45045	0.39640	0.45045	0.39640	0.38739
7	PIR5	0.49550	0.44144	0.54955	0.45946	0.49550	0.49550	0.46847
8	PIR6	0.51351	0.44144	0.51351	0.49550	0.45946	0.49550	0.45045
9	PIR7	0.47748	0.40541	0.47748	0.45946	0.44144	0.45946	0.41441
10	PIR8	0.46847	0.39640	0.48649	0.45045	0.45045	0.45045	0.40541
11	PIR9	0.40541	0.38739	0.42342	0.38739	0.44144	0.42342	0.39640
12	PIR10	0.38739	0.35135	0.42342	0.38739	0.42342	0.40541	0.37838
13	CAE1	0.42342	0.42342	0.42342	0.42342	0.44144	0.44144	0.41441
14	CAE2	0.41441	0.37838	0.43243	0.36036	0.43243	0.41441	0.40541
15	CAE3	0.42342	0.38739	0.42342	0.40541	0.42342	0.38739	0.37838
16	CAE4	0.49550	0.42342	0.49550	0.45946	0.44144	0.45946	0.43243
17	CAE5	0.42342	0.42342	0.44144	0.42342	0.44144	0.38739	0.39640
18	CAE6	0.51351	0.47748	0.51351	0.45946	0.49550	0.45946	0.48649
19	CAE7	0.51351	0.45946	0.49550	0.44144	0.45946	0.47748	0.45045
20	CAE8	0.45045	0.41441	0.43243	0.41441	0.41441	0.41441	0.40541
21	CAE9	0.45946	0.45946	0.47748	0.45946	0.49550	0.47748	0.46847
22	CAE10	0.47748	0.49550	0.53153	0.45946	0.49550	0.51351	0.48649
23	PEQ1	0.41441	0.41441	0.43243	0.39640	0.45045	0.43243	0.38739

24	PEQ2	0.40541	0.36937	0.44144	0.42342	0.44144	0.44144	0.39640
25	PEQ3	0.39640	0.36036	0.41441	0.41441	0.41441	0.39640	0.38739
26	PEQ4	0.34234	0.32432	0.37838	0.36036	0.37838	0.36036	0.31532
27	PEQ5	0.39640	0.37838	0.43243	0.39640	0.45045	0.39640	0.36937
28	PEQ6	0.44144	0.38739	0.44144	0.44144	0.44144	0.44144	0.39640
29	PEQ7	0.41441	0.37838	0.43243	0.43243	0.43243	0.41441	0.38739
30	PEQ8	0.45946	0.45946	0.47748	0.47748	0.51351	0.45946	0.45045
31	PEQ9	0.45045	0.41441	0.48649	0.46847	0.46847	0.45045	0.42342
32	PEQ10	0.45045	0.43243	0.46847	0.45045	0.48649	0.46847	0.42342
33	VAR1	0.30631	0.27027	0.36036	0.34234	0.34234	0.36036	0.29730
34	VAR2	0.29730	0.26126	0.35135	0.31532	0.33333	0.35135	0.28829
35	VAR3	0.36036	0.36036	0.41441	0.39640	0.43243	0.41441	0.36937
36	VAR4	0.34234	0.28829	0.36036	0.36036	0.36036	0.39640	0.31532
37	VAR5	0.35135	0.31532	0.38739	0.38739	0.38739	0.40541	0.34234
38	VAR6	0.34234	0.32432	0.37838	0.36036	0.39640	0.39640	0.33333
39	VAR7	0.31532	0.29730	0.36937	0.33333	0.36937	0.36937	0.32432
40	VAR8	0.33333	0.31532	0.36937	0.35135	0.38739	0.38739	0.34234
41	VAR9	0.30631	0.28829	0.34234	0.30631	0.34234	0.34234	0.31532
42	VAR10	0.35135	0.29730	0.35135	0.33333	0.36937	0.40541	0.32432
43	AGU1	0.39640	0.36036	0.39640	0.36036	0.37838	0.41441	0.35135
44	AGU2	0.43243	0.37838	0.43243	0.37838	0.41441	0.41441	0.38739
45	AGU3	0.39640	0.34234	0.37838	0.36036	0.36036	0.39640	0.35135
46	AGU4	0.44144	0.42342	0.40541	0.40541	0.44144	0.45946	0.39640
47	AGU5	0.41441	0.37838	0.39640	0.37838	0.43243	0.41441	0.36937
48	AGU6	0.43243	0.37838	0.45045	0.41441	0.43243	0.43243	0.38739
49	AGU7	0.41441	0.37838	0.43243	0.37838	0.41441	0.41441	0.36937
50	AGU8	0.45045	0.39640	0.41441	0.39640	0.39640	0.43243	0.38739
51	AGU9	0.43243	0.39640	0.39640	0.37838	0.39640	0.41441	0.36937
52	AGU10	0.41441	0.37838	0.41441	0.39640	0.41441	0.39640	0.35135
53	MER1	0.22523	0.20721	0.20721	0.27928	0.24324	0.24324	0.25225
54	MER2	0.22523	0.24324	0.24324	0.27928	0.27928	0.29730	0.28829
55	MER3	0.27928	0.26126	0.24324	0.26126	0.29730	0.27928	0.27027
56	MER4	0.24324	0.20721	0.22523	0.26126	0.27928	0.29730	0.25225
57	MER5	0.24324	0.24324	0.24324	0.26126	0.29730	0.27928	0.27027
58	MER6	0.22523	0.20721	0.24324	0.26126	0.27928	0.26126	0.23423
59	MER7	0.18018	0.14414	0.19820	0.21622	0.16216	0.19820	0.15315
60	MER8	0.20721	0.17117	0.20721	0.22523	0.24324	0.24324	0.23423
61	MER9	0.19820	0.18018	0.19820	0.19820	0.23423	0.21622	0.22523
62	MER10	0.20721	0.20721	0.24324	0.22523	0.26126	0.26126	0.21622
63	RIB1	0.09009	0.18018	0.16216	0.18018	0.14414	0.18018	0.17117
64	RIB2	-	0.10811	0.12613	0.16216	0.16216	0.10811	0.11712
65	RIB3	12	-	0.14414	0.14414	0.14414	0.14414	0.08108
66	RIB4	14	16	-	0.18018	0.14414	0.16216	0.13514
67	RIB5	18	16	20	-	0.19820	0.19820	0.17117
68	RIB6	18	16	16	22	-	0.16216	0.09910
69	RIB7	12	16	18	22	18	-	0.13514
70	RIB8	13	9	15	19	11	15	-
71	RIB9	21	17	19	23	21	21	16
72	RIB10	25	21	21	19	21	23	18
73	MON1	45	39	45	41	43	45	42
74	MON2	44	40	42	46	44	46	43
75	MON3	39	35	35	37	39	41	38
76	MON4	37	33	37	39	39	39	34
77	MON5	43	39	45	43	43	43	40
78	MON6	45	39	43	45	45	43	42
79	MON7	39	37	37	43	41	41	38
80	MON8	34	34	32	40	38	38	35
81	MON9	41	41	41	41	41	43	44
82	MON10	38	38	36	44	40	42	41
83	ITA1	35	33	37	35	35	37	34
84	ITA2	35	31	33	37	31	39	34

85	ITA3	37	35	37	37	37	41	38
86	ITA4	42	36	42	40	36	42	39
87	ITA5	39	33	37	35	35	39	36
88	ITA6	39	37	37	41	39	41	38
89	ITA7	45	39	41	43	41	41	40
90	ITA8	41	35	39	43	37	41	34
91	ITA9	38	32	36	34	38	40	37
92	ITA10	41	35	41	39	33	41	36
93	ACA1	50	46	50	48	48	48	51
94	ACA2	48	46	48	48	46	44	45
95	ACA3	48	44	52	48	48	44	47
96	ACA4	45	43	49	43	47	41	46
97	ACA5	47	43	49	47	45	45	48
98	ACA6	48	46	54	50	50	46	47
99	ACA7	50	48	50	46	50	46	49
100	ACA8	47	47	51	51	47	43	44
101	ACA9	45	45	47	45	47	43	46
102	ACA10	44	44	48	48	46	42	45

		71	72	73	74	75	76	77
1	<i>M.lateralis1</i>	0.35135	0.36937	0.27928	0.27027	0.22523	0.29730	0.31532
2	<i>M.lateralis2</i>	0.35135	0.36937	0.27928	0.27027	0.22523	0.29730	0.31532
3	PIR1	0.37838	0.39640	0.45045	0.49550	0.43243	0.48649	0.46847
4	PIR2	0.38739	0.42342	0.44144	0.48649	0.42342	0.45946	0.44144
5	PIR3	0.40541	0.42342	0.42342	0.48649	0.40541	0.44144	0.44144
6	PIR4	0.36937	0.40541	0.42342	0.48649	0.38739	0.42342	0.44144
7	PIR5	0.45045	0.46847	0.41441	0.49550	0.41441	0.45045	0.43243
8	PIR6	0.45045	0.46847	0.46847	0.47748	0.45045	0.46847	0.45045
9	PIR7	0.41441	0.43243	0.48649	0.47748	0.48649	0.46847	0.45045
10	PIR8	0.40541	0.42342	0.42342	0.45045	0.42342	0.42342	0.40541
11	PIR9	0.34234	0.37838	0.43243	0.44144	0.39640	0.41441	0.41441
12	PIR10	0.34234	0.37838	0.39640	0.38739	0.37838	0.39640	0.37838
13	CAE1	0.37838	0.37838	0.37838	0.36937	0.34234	0.39640	0.39640
14	CAE2	0.40541	0.38739	0.33333	0.34234	0.35135	0.40541	0.40541
15	CAE3	0.34234	0.36036	0.39640	0.42342	0.32432	0.43243	0.45045
16	CAE4	0.45045	0.43243	0.41441	0.40541	0.41441	0.48649	0.45045
17	CAE5	0.39640	0.39640	0.32432	0.31532	0.32432	0.36036	0.36036
18	CAE6	0.45045	0.45045	0.43243	0.44144	0.43243	0.54054	0.50450
19	CAE7	0.48649	0.46847	0.43243	0.44144	0.46847	0.50450	0.48649
20	CAE8	0.42342	0.38739	0.29730	0.30631	0.31532	0.35135	0.31532
21	CAE9	0.41441	0.45045	0.43243	0.49550	0.39640	0.46847	0.48649
22	CAE10	0.46847	0.45045	0.39640	0.45946	0.43243	0.48649	0.45045
23	PEQ1	0.42342	0.44144	0.42342	0.45045	0.42342	0.44144	0.45946
24	PEQ2	0.39640	0.43243	0.41441	0.44144	0.37838	0.41441	0.43243
25	PEQ3	0.38739	0.44144	0.36937	0.39640	0.33333	0.36937	0.38739
26	PEQ4	0.35135	0.38739	0.38739	0.41441	0.36937	0.38739	0.40541
27	PEQ5	0.36937	0.38739	0.44144	0.45045	0.40541	0.45946	0.45946
28	PEQ6	0.36036	0.41441	0.45045	0.47748	0.41441	0.46847	0.46847
29	PEQ7	0.38739	0.44144	0.44144	0.48649	0.42342	0.45946	0.47748
30	PEQ8	0.43243	0.46847	0.43243	0.47748	0.43243	0.45045	0.45045
31	PEQ9	0.44144	0.47748	0.45946	0.50450	0.44144	0.49550	0.51351
32	PEQ10	0.44144	0.45946	0.44144	0.46847	0.44144	0.45946	0.45946
33	VAR1	0.31532	0.38739	0.38739	0.41441	0.36937	0.38739	0.42342
34	VAR2	0.30631	0.36036	0.34234	0.36937	0.34234	0.36036	0.37838
35	VAR3	0.38739	0.42342	0.38739	0.41441	0.38739	0.40541	0.44144
36	VAR4	0.33333	0.40541	0.36937	0.41441	0.36937	0.38739	0.42342
37	VAR5	0.36036	0.41441	0.37838	0.42342	0.37838	0.37838	0.41441
38	VAR6	0.35135	0.40541	0.40541	0.45045	0.38739	0.38739	0.44144
39	VAR7	0.34234	0.37838	0.34234	0.36937	0.34234	0.36036	0.37838
40	VAR8	0.36036	0.39640	0.32432	0.35135	0.32432	0.36036	0.37838
41	VAR9	0.33333	0.36937	0.31532	0.34234	0.31532	0.33333	0.35135



42	VAR10	0.34234	0.37838	0.32432	0.35135	0.30631	0.34234	0.37838
43	AGU1	0.40541	0.42342	0.44144	0.45045	0.40541	0.42342	0.45946
44	AGU2	0.38739	0.38739	0.42342	0.46847	0.36937	0.44144	0.45946
45	AGU3	0.35135	0.36937	0.44144	0.46847	0.38739	0.44144	0.45946
46	AGU4	0.39640	0.39640	0.46847	0.47748	0.41441	0.43243	0.46847
47	AGU5	0.38739	0.38739	0.47748	0.48649	0.40541	0.44144	0.47748
48	AGU6	0.40541	0.42342	0.45946	0.46847	0.44144	0.45946	0.45946
49	AGU7	0.40541	0.42342	0.45946	0.46847	0.40541	0.44144	0.47748
50	AGU8	0.40541	0.38739	0.44144	0.46847	0.42342	0.45946	0.45946
51	AGU9	0.38739	0.36937	0.45946	0.48649	0.40541	0.45946	0.47748
52	AGU10	0.38739	0.38739	0.45946	0.46847	0.40541	0.44144	0.45946
53	MER1	0.27027	0.30631	0.30631	0.27928	0.25225	0.32432	0.34234
54	MER2	0.30631	0.28829	0.34234	0.33333	0.28829	0.36036	0.36036
55	MER3	0.28829	0.27027	0.28829	0.29730	0.23423	0.27027	0.28829
56	MER4	0.23423	0.23423	0.30631	0.29730	0.23423	0.34234	0.34234
57	MER5	0.27027	0.28829	0.30631	0.31532	0.25225	0.34234	0.34234
58	MER6	0.25225	0.27027	0.34234	0.29730	0.30631	0.32432	0.32432
59	MER7	0.27928	0.22523	0.33333	0.30631	0.27928	0.31532	0.31532
60	MER8	0.21622	0.19820	0.32432	0.29730	0.30631	0.36036	0.32432
61	MER9	0.22523	0.27928	0.35135	0.34234	0.29730	0.33333	0.35135
62	MER10	0.23423	0.27027	0.34234	0.31532	0.28829	0.30631	0.30631
63	RIB1	0.22523	0.24324	0.40541	0.41441	0.36937	0.35135	0.38739
64	RIB2	0.18919	0.22523	0.40541	0.39640	0.35135	0.33333	0.38739
65	RIB3	0.15315	0.18919	0.35135	0.36036	0.31532	0.29730	0.35135
66	RIB4	0.17117	0.18919	0.40541	0.37838	0.31532	0.33333	0.40541
67	RIB5	0.20721	0.17117	0.36937	0.41441	0.33333	0.35135	0.38739
68	RIB6	0.18919	0.18919	0.38739	0.39640	0.35135	0.35135	0.38739
69	RIB7	0.18919	0.20721	0.40541	0.41441	0.36937	0.35135	0.38739
70	RIB8	0.14414	0.16216	0.37838	0.38739	0.34234	0.30631	0.36036
71	RIB9	-	0.10811	0.36036	0.36937	0.30631	0.32432	0.36036
72	RIB10	12	-	0.36036	0.36937	0.30631	0.34234	0.34234
73	MON1	40	40	-	0.13514	0.10811	0.16216	0.12613
74	MON2	41	41	15	-	0.17117	0.17117	0.13514
75	MON3	34	34	12	19	-	0.18018	0.19820
76	MON4	36	38	18	19	20	-	0.09009
77	MON5	40	38	14	15	22	10	-
78	MON6	42	40	16	15	20	12	12
79	MON7	40	40	20	17	16	18	16
80	MON8	37	39	21	16	19	17	19
81	MON9	40	38	20	23	20	14	16
82	MON10	33	35	17	14	17	19	13
83	ITA1	36	34	24	23	24	24	24
84	ITA2	34	32	26	25	22	26	28
85	ITA3	38	36	24	25	20	22	26
86	ITA4	39	41	19	26	19	23	23
87	ITA5	38	32	22	23	18	22	26
88	ITA6	38	36	30	27	20	26	26
89	ITA7	38	38	26	27	22	28	28
90	ITA8	40	40	24	25	20	24	22
91	ITA9	41	37	27	30	27	25	25
92	ITA10	40	38	26	25	26	26	20
93	ACA1	45	45	31	32	35	41	35
94	ACA2	43	43	37	36	37	41	39
95	ACA3	41	43	33	36	37	43	39
96	ACA4	40	40	34	35	34	40	40
97	ACA5	42	44	34	35	38	42	36
98	ACA6	43	43	35	36	39	41	39
99	ACA7	43	41	35	38	37	43	39
100	ACA8	42	42	34	37	36	38	36
101	ACA9	42	40	36	37	36	38	36
102	ACA10	41	43	35	36	35	39	37

	78	79	80	81	82	83	84
1 <i>M.lateralis</i> 1	0.33333	0.26126	0.25225	0.33333	0.28829	0.27928	0.29730
2 <i>M.lateralis</i> 2	0.33333	0.26126	0.25225	0.33333	0.28829	0.27928	0.29730
3 PIR1	0.52252	0.50450	0.47748	0.48649	0.44144	0.41441	0.45045
4 PIR2	0.49550	0.45946	0.45045	0.47748	0.43243	0.44144	0.47748
5 PIR3	0.51351	0.49550	0.45045	0.45946	0.43243	0.42342	0.47748
6 PIR4	0.49550	0.45946	0.43243	0.45946	0.43243	0.42342	0.45946
7 PIR5	0.50450	0.46847	0.47748	0.45045	0.45946	0.41441	0.45045
8 PIR6	0.48649	0.46847	0.47748	0.46847	0.42342	0.39640	0.43243
9 PIR7	0.50450	0.48649	0.49550	0.48649	0.44144	0.41441	0.46847
10 PIR8	0.47748	0.45946	0.45045	0.47748	0.43243	0.42342	0.45946
11 PIR9	0.48649	0.45045	0.40541	0.45045	0.36937	0.39640	0.45045
12 PIR10	0.43243	0.39640	0.36937	0.41441	0.33333	0.37838	0.39640
13 CAE1	0.43243	0.37838	0.35135	0.39640	0.33333	0.37838	0.39640
14 CAE2	0.44144	0.38739	0.36036	0.42342	0.39640	0.38739	0.36937
15 CAE3	0.46847	0.41441	0.40541	0.46847	0.42342	0.37838	0.34234
16 CAE4	0.48649	0.45045	0.44144	0.46847	0.42342	0.41441	0.39640
17 CAE5	0.39640	0.36036	0.33333	0.39640	0.35135	0.36036	0.39640
18 CAE6	0.52252	0.48649	0.47748	0.50450	0.45946	0.46847	0.46847
19 CAE7	0.50450	0.48649	0.49550	0.48649	0.47748	0.45045	0.46847
20 CAE8	0.38739	0.35135	0.32432	0.36937	0.34234	0.38739	0.36937
21 CAE9	0.50450	0.46847	0.45946	0.48649	0.44144	0.46847	0.48649
22 CAE10	0.50450	0.48649	0.47748	0.46847	0.45946	0.46847	0.46847
23 PEQ1	0.51351	0.49550	0.45045	0.47748	0.46847	0.42342	0.47748
24 PEQ2	0.48649	0.46847	0.40541	0.45045	0.42342	0.45045	0.41441
25 PEQ3	0.45946	0.42342	0.36036	0.40541	0.39640	0.42342	0.36937
26 PEQ4	0.45946	0.44144	0.37838	0.44144	0.39640	0.35135	0.42342
27 PEQ5	0.51351	0.47748	0.43243	0.49550	0.45045	0.44144	0.44144
28 PEQ6	0.50450	0.46847	0.44144	0.48649	0.44144	0.50450	0.48649
29 PEQ7	0.49550	0.47748	0.45045	0.49550	0.45045	0.47748	0.47748
30 PEQ8	0.52252	0.50450	0.45946	0.46847	0.44144	0.45045	0.48649
31 PEQ9	0.53153	0.51351	0.48649	0.53153	0.50450	0.45946	0.45946
32 PEQ10	0.54955	0.53153	0.46847	0.49550	0.46847	0.44144	0.45946
33 VAR1	0.47748	0.42342	0.37838	0.44144	0.41441	0.38739	0.38739
34 VAR2	0.45045	0.39640	0.33333	0.39640	0.36937	0.34234	0.34234
35 VAR3	0.49550	0.45946	0.39640	0.45946	0.43243	0.38739	0.40541
36 VAR4	0.45946	0.42342	0.37838	0.44144	0.41441	0.40541	0.38739
37 VAR5	0.46847	0.43243	0.38739	0.43243	0.40541	0.39640	0.41441
38 VAR6	0.49550	0.45946	0.41441	0.45946	0.43243	0.40541	0.44144
39 VAR7	0.45045	0.39640	0.33333	0.39640	0.36937	0.37838	0.37838
40 VAR8	0.43243	0.37838	0.31532	0.39640	0.36937	0.36036	0.36036
41 VAR9	0.42342	0.36937	0.30631	0.36937	0.34234	0.35135	0.35135
42 VAR10	0.41441	0.36036	0.31532	0.39640	0.36937	0.36036	0.34234
43 AGU1	0.51351	0.45946	0.41441	0.47748	0.45045	0.40541	0.38739
44 AGU2	0.49550	0.44144	0.41441	0.45946	0.43243	0.44144	0.40541
45 AGU3	0.51351	0.45946	0.41441	0.45946	0.41441	0.40541	0.38739
46 AGU4	0.54054	0.48649	0.44144	0.48649	0.44144	0.45045	0.43243
47 AGU5	0.53153	0.47748	0.43243	0.51351	0.45045	0.44144	0.44144
48 AGU6	0.53153	0.49550	0.45045	0.51351	0.46847	0.42342	0.40541
49 AGU7	0.51351	0.47748	0.43243	0.51351	0.46847	0.38739	0.40541
50 AGU8	0.53153	0.49550	0.45045	0.47748	0.45045	0.42342	0.42342
51 AGU9	0.53153	0.49550	0.45045	0.49550	0.45045	0.42342	0.44144
52 AGU10	0.51351	0.47748	0.43243	0.51351	0.45045	0.42342	0.44144
53 MER1	0.36036	0.30631	0.26126	0.30631	0.26126	0.23423	0.21622
54 MER2	0.41441	0.36036	0.29730	0.34234	0.31532	0.32432	0.27027
55 MER3	0.32432	0.28829	0.27928	0.30631	0.27928	0.27027	0.25225
56 MER4	0.37838	0.32432	0.26126	0.32432	0.26126	0.28829	0.23423
57 MER5	0.39640	0.34234	0.27928	0.36036	0.29730	0.27027	0.23423
58 MER6	0.37838	0.30631	0.26126	0.34234	0.29730	0.30631	0.27027

59	MER7	0.33333	0.29730	0.27027	0.35135	0.30631	0.26126	0.24324
60	MER8	0.34234	0.30631	0.26126	0.32432	0.24324	0.25225	0.23423
61	MER9	0.40541	0.35135	0.32432	0.35135	0.32432	0.31532	0.29730
62	MER10	0.39640	0.34234	0.31532	0.36036	0.29730	0.28829	0.30631
63	RIB1	0.44144	0.38739	0.34234	0.36937	0.37838	0.31532	0.29730
64	RIB2	0.40541	0.35135	0.30631	0.36937	0.34234	0.31532	0.31532
65	RIB3	0.35135	0.33333	0.30631	0.36937	0.34234	0.29730	0.27928
66	RIB4	0.38739	0.33333	0.28829	0.36937	0.32432	0.33333	0.29730
67	RIB5	0.40541	0.38739	0.36036	0.36937	0.39640	0.31532	0.33333
68	RIB6	0.40541	0.36937	0.34234	0.36937	0.36036	0.31532	0.27928
69	RIB7	0.38739	0.36937	0.34234	0.38739	0.37838	0.33333	0.35135
70	RIB8	0.37838	0.34234	0.31532	0.39640	0.36937	0.30631	0.30631
71	RIB9	0.37838	0.36036	0.33333	0.36036	0.29730	0.32432	0.30631
72	RIB10	0.36036	0.36036	0.35135	0.34234	0.31532	0.30631	0.28829
73	MON1	0.14414	0.18018	0.18919	0.18018	0.15315	0.21622	0.23423
74	MON2	0.13514	0.15315	0.14414	0.20721	0.12613	0.20721	0.22523
75	MON3	0.18018	0.14414	0.17117	0.18018	0.15315	0.21622	0.19820
76	MON4	0.10811	0.16216	0.15315	0.12613	0.17117	0.21622	0.23423
77	MON5	0.10811	0.14414	0.17117	0.14414	0.11712	0.21622	0.25225
78	MON6	-	0.09009	0.15315	0.14414	0.15315	0.23423	0.27027
79	MON7	10	-	0.11712	0.18018	0.11712	0.25225	0.23423
80	MON8	17	13	-	0.15315	0.12613	0.26126	0.22523
81	MON9	16	20	17	-	0.15315	0.23423	0.21622
82	MON10	17	13	14	17	-	0.20721	0.20721
83	ITA1	26	28	29	26	23	-	0.12613
84	ITA2	30	26	25	24	23	14	-
85	ITA3	26	28	25	22	21	14	8
86	ITA4	23	23	26	19	24	15	15
87	ITA5	22	24	25	20	23	18	16
88	ITA6	28	24	25	20	23	20	20
89	ITA7	24	30	33	22	27	14	24
90	ITA8	22	20	25	26	25	14	20
91	ITA9	27	27	26	23	26	17	21
92	ITA10	26	24	27	24	25	14	18
93	ACA1	39	43	40	39	36	43	39
94	ACA2	45	47	42	41	40	43	39
95	ACA3	41	43	40	41	38	47	43
96	ACA4	42	46	45	40	39	42	42
97	ACA5	42	46	41	40	37	42	38
98	ACA6	43	47	44	43	38	43	45
99	ACA7	43	45	42	41	40	47	43
100	ACA8	40	44	41	40	35	40	42
101	ACA9	42	48	43	38	37	38	40
102	ACA10	41	45	40	41	36	41	37

		85	86	87	88	89	90	91
1	<i>M.lateralis1</i>	0.29730	0.32432	0.33333	0.33333	0.31532	0.27928	0.30631
2	<i>M.lateralis2</i>	0.29730	0.32432	0.33333	0.33333	0.31532	0.27928	0.30631
3	PIR1	0.43243	0.44144	0.45045	0.48649	0.43243	0.46847	0.45946
4	PIR2	0.45946	0.41441	0.45946	0.45946	0.44144	0.47748	0.45045
5	PIR3	0.44144	0.43243	0.45946	0.45946	0.44144	0.42342	0.45045
6	PIR4	0.44144	0.39640	0.47748	0.45946	0.42342	0.44144	0.45045
7	PIR5	0.45045	0.42342	0.46847	0.45045	0.43243	0.43243	0.42342
8	PIR6	0.43243	0.42342	0.43243	0.43243	0.39640	0.41441	0.42342
9	PIR7	0.48649	0.45946	0.48649	0.46847	0.41441	0.43243	0.44144
10	PIR8	0.47748	0.45045	0.45946	0.47748	0.42342	0.42342	0.45045
11	PIR9	0.41441	0.42342	0.45045	0.43243	0.43243	0.43243	0.42342
12	PIR10	0.37838	0.38739	0.39640	0.41441	0.41441	0.39640	0.38739
13	CAE1	0.37838	0.38739	0.41441	0.36036	0.39640	0.39640	0.36937
14	CAE2	0.40541	0.39640	0.38739	0.40541	0.40541	0.42342	0.37838

15	CAE3	0.36036	0.36937	0.39640	0.37838	0.37838	0.41441	0.40541
16	CAE4	0.41441	0.38739	0.43243	0.41441	0.43243	0.45045	0.42342
17	CAE5	0.39640	0.40541	0.39640	0.39640	0.39640	0.36036	0.36937
18	CAE6	0.46847	0.44144	0.46847	0.46847	0.48649	0.50450	0.47748
19	CAE7	0.46847	0.45946	0.45045	0.48649	0.46847	0.45045	0.44144
20	CAE8	0.38739	0.37838	0.38739	0.36937	0.38739	0.36937	0.36036
21	CAE9	0.46847	0.45946	0.50450	0.48649	0.46847	0.46847	0.45946
22	CAE10	0.46847	0.47748	0.50450	0.50450	0.50450	0.46847	0.47748
23	PEQ1	0.45946	0.45045	0.42342	0.45946	0.42342	0.44144	0.46847
24	PEQ2	0.41441	0.42342	0.41441	0.43243	0.43243	0.45045	0.45946
25	PEQ3	0.40541	0.41441	0.40541	0.42342	0.40541	0.40541	0.41441
26	PEQ4	0.40541	0.37838	0.40541	0.40541	0.36937	0.38739	0.41441
27	PEQ5	0.44144	0.43243	0.42342	0.44144	0.42342	0.47748	0.48649
28	PEQ6	0.50450	0.47748	0.45045	0.52252	0.48649	0.46847	0.53153
29	PEQ7	0.47748	0.46847	0.44144	0.53153	0.47748	0.45946	0.52252
30	PEQ8	0.46847	0.45946	0.46847	0.48649	0.43243	0.46847	0.47748
31	PEQ9	0.47748	0.45045	0.44144	0.51351	0.45946	0.47748	0.54054
32	PEQ10	0.44144	0.46847	0.45946	0.45946	0.44144	0.45946	0.46847
33	VAR1	0.42342	0.41441	0.38739	0.42342	0.40541	0.38739	0.43243
34	VAR2	0.37838	0.36937	0.37838	0.41441	0.39640	0.37838	0.38739
35	VAR3	0.38739	0.41441	0.44144	0.42342	0.44144	0.40541	0.41441
36	VAR4	0.40541	0.41441	0.40541	0.44144	0.42342	0.36937	0.41441
37	VAR5	0.43243	0.42342	0.39640	0.43243	0.39640	0.39640	0.42342
38	VAR6	0.44144	0.45045	0.44144	0.44144	0.40541	0.40541	0.43243
39	VAR7	0.39640	0.40541	0.37838	0.41441	0.41441	0.39640	0.38739
40	VAR8	0.37838	0.36937	0.37838	0.37838	0.39640	0.37838	0.36937
41	VAR9	0.36937	0.37838	0.33333	0.38739	0.38739	0.36937	0.36036
42	VAR10	0.37838	0.36937	0.34234	0.37838	0.37838	0.36036	0.36937
43	AGU1	0.42342	0.43243	0.42342	0.45946	0.44144	0.42342	0.45045
44	AGU2	0.42342	0.41441	0.38739	0.44144	0.42342	0.45946	0.45045
45	AGU3	0.42342	0.39640	0.42342	0.44144	0.42342	0.44144	0.45045
46	AGU4	0.46847	0.47748	0.46847	0.48649	0.45045	0.46847	0.47748
47	AGU5	0.45946	0.45045	0.44144	0.45946	0.44144	0.47748	0.46847
48	AGU6	0.45946	0.45045	0.44144	0.49550	0.44144	0.45946	0.48649
49	AGU7	0.42342	0.43243	0.40541	0.45946	0.42342	0.42342	0.46847
50	AGU8	0.47748	0.45045	0.42342	0.47748	0.42342	0.45946	0.46847
51	AGU9	0.45946	0.45045	0.42342	0.45946	0.42342	0.45946	0.46847
52	AGU10	0.44144	0.45045	0.42342	0.45946	0.44144	0.44144	0.46847
53	MER1	0.25225	0.27928	0.28829	0.30631	0.30631	0.27027	0.26126
54	MER2	0.30631	0.33333	0.34234	0.32432	0.36036	0.34234	0.27928
55	MER3	0.27027	0.26126	0.30631	0.28829	0.30631	0.28829	0.26126
56	MER4	0.25225	0.29730	0.28829	0.28829	0.34234	0.30631	0.31532
57	MER5	0.25225	0.31532	0.32432	0.30631	0.32432	0.28829	0.26126
58	MER6	0.30631	0.29730	0.34234	0.32432	0.34234	0.30631	0.27928
59	MER7	0.26126	0.27027	0.29730	0.31532	0.35135	0.27928	0.28829
60	MER8	0.25225	0.27928	0.30631	0.30631	0.32432	0.30631	0.22523
61	MER9	0.29730	0.30631	0.36937	0.33333	0.35135	0.33333	0.28829
62	MER10	0.32432	0.33333	0.36036	0.32432	0.32432	0.34234	0.27928
63	RIB1	0.31532	0.34234	0.35135	0.35135	0.40541	0.36937	0.34234
64	RIB2	0.33333	0.37838	0.35135	0.35135	0.40541	0.36937	0.34234
65	RIB3	0.31532	0.32432	0.29730	0.33333	0.35135	0.31532	0.28829
66	RIB4	0.33333	0.37838	0.33333	0.33333	0.36937	0.35135	0.32432
67	RIB5	0.33333	0.36036	0.31532	0.36937	0.38739	0.38739	0.30631
68	RIB6	0.33333	0.32432	0.31532	0.35135	0.36937	0.33333	0.34234
69	RIB7	0.36937	0.37838	0.35135	0.36937	0.36937	0.36937	0.36036
70	RIB8	0.34234	0.35135	0.32432	0.34234	0.36036	0.30631	0.33333
71	RIB9	0.34234	0.35135	0.34234	0.34234	0.34234	0.36036	0.36937
72	RIB10	0.32432	0.36937	0.28829	0.32432	0.34234	0.36036	0.33333
73	MON1	0.21622	0.17117	0.19820	0.27027	0.23423	0.21622	0.24324
74	MON2	0.22523	0.23423	0.20721	0.24324	0.24324	0.22523	0.27027
75	MON3	0.18018	0.17117	0.16216	0.18018	0.19820	0.18018	0.24324

76	MON4	0.19820	0.20721	0.19820	0.23423	0.25225	0.21622	0.22523
77	MON5	0.23423	0.20721	0.23423	0.23423	0.25225	0.19820	0.22523
78	MON6	0.23423	0.20721	0.19820	0.25225	0.21622	0.19820	0.24324
79	MON7	0.25225	0.20721	0.21622	0.21622	0.27027	0.18018	0.24324
80	MON8	0.22523	0.23423	0.22523	0.22523	0.29730	0.22523	0.23423
81	MON9	0.19820	0.17117	0.18018	0.18018	0.19820	0.23423	0.20721
82	MON10	0.18919	0.21622	0.20721	0.20721	0.24324	0.22523	0.23423
83	ITA1	0.12613	0.13514	0.16216	0.18018	0.12613	0.12613	0.15315
84	ITA2	0.07207	0.13514	0.14414	0.18018	0.21622	0.18018	0.18919
85	ITA3	-	0.11712	0.12613	0.14414	0.21622	0.18018	0.15315
86	ITA4	13	-	0.17117	0.17117	0.18919	0.18919	0.19820
87	ITA5	14	19	-	0.14414	0.18018	0.21622	0.20721
88	ITA6	16	19	16	-	0.16216	0.18018	0.13514
89	ITA7	24	21	20	18	-	0.16216	0.17117
90	ITA8	20	21	24	20	18	-	0.15315
91	ITA9	17	22	23	15	19	17	-
92	ITA10	20	17	22	18	18	16	13
93	ACA1	39	40	43	45	41	39	40
94	ACA2	37	42	45	45	43	39	42
95	ACA3	43	42	45	49	45	41	44
96	ACA4	40	41	42	46	38	44	43
97	ACA5	38	41	44	44	44	38	41
98	ACA6	41	44	47	49	43	39	44
99	ACA7	41	44	45	47	45	41	44
100	ACA8	38	41	46	48	42	36	45
101	ACA9	36	39	42	40	36	38	37
102	ACA10	35	40	43	43	41	39	40

		92	93	94	95	96	97	98
1	<i>M.lateralis1</i>	0.29730	0.41441	0.39640	0.41441	0.38739	0.44144	0.41441
2	<i>M.lateralis2</i>	0.29730	0.41441	0.39640	0.41441	0.38739	0.44144	0.41441
3	PIR1	0.43243	0.44144	0.40541	0.38739	0.36036	0.43243	0.36937
4	PIR2	0.44144	0.43243	0.41441	0.36036	0.36937	0.42342	0.36036
5	PIR3	0.44144	0.41441	0.37838	0.36036	0.36937	0.40541	0.32432
6	PIR4	0.44144	0.43243	0.39640	0.36036	0.36937	0.42342	0.34234
7	PIR5	0.41441	0.44144	0.44144	0.40541	0.41441	0.43243	0.40541
8	PIR6	0.39640	0.42342	0.42342	0.40541	0.39640	0.41441	0.38739
9	PIR7	0.41441	0.42342	0.40541	0.36937	0.37838	0.39640	0.35135
10	PIR8	0.42342	0.41441	0.39640	0.36036	0.38739	0.40541	0.34234
11	PIR9	0.43243	0.40541	0.36937	0.35135	0.36036	0.39640	0.31532
12	PIR10	0.37838	0.36937	0.35135	0.31532	0.34234	0.36036	0.29730
13	CAE1	0.37838	0.36937	0.33333	0.33333	0.36036	0.37838	0.35135
14	CAE2	0.36937	0.37838	0.36036	0.32432	0.35135	0.38739	0.34234
15	CAE3	0.39640	0.40541	0.35135	0.35135	0.36036	0.39640	0.36937
16	CAE4	0.39640	0.36937	0.33333	0.33333	0.36036	0.36036	0.33333
17	CAE5	0.36036	0.31532	0.27928	0.27928	0.30631	0.32432	0.29730
18	CAE6	0.46847	0.40541	0.36937	0.33333	0.37838	0.39640	0.35135
19	CAE7	0.45045	0.44144	0.40541	0.36937	0.41441	0.43243	0.36937
20	CAE8	0.33333	0.34234	0.32432	0.30631	0.35135	0.35135	0.32432
21	CAE9	0.48649	0.44144	0.40541	0.36937	0.39640	0.41441	0.38739
22	CAE10	0.46847	0.40541	0.38739	0.35135	0.39640	0.37838	0.36937
23	PEQ1	0.45946	0.45045	0.43243	0.39640	0.38739	0.45946	0.36036
24	PEQ2	0.45045	0.36937	0.38739	0.36937	0.36036	0.39640	0.33333
25	PEQ3	0.38739	0.32432	0.32432	0.30631	0.27928	0.33333	0.30631
26	PEQ4	0.38739	0.43243	0.41441	0.39640	0.36937	0.44144	0.36036
27	PEQ5	0.44144	0.43243	0.41441	0.39640	0.36937	0.44144	0.37838
28	PEQ6	0.48649	0.42342	0.40541	0.35135	0.39640	0.41441	0.36937
29	PEQ7	0.49550	0.41441	0.39640	0.36036	0.35135	0.40541	0.36036
30	PEQ8	0.46847	0.40541	0.40541	0.38739	0.36036	0.43243	0.36937
31	PEQ9	0.49550	0.46847	0.45045	0.41441	0.42342	0.45946	0.39640

32	PEQ10	0.45946	0.43243	0.41441	0.41441	0.38739	0.44144	0.36036
33	VAR1	0.40541	0.39640	0.37838	0.34234	0.35135	0.38739	0.36036
34	VAR2	0.34234	0.36937	0.35135	0.31532	0.32432	0.36036	0.33333
35	VAR3	0.44144	0.41441	0.37838	0.36036	0.36937	0.40541	0.32432
36	VAR4	0.42342	0.41441	0.39640	0.36036	0.38739	0.40541	0.37838
37	VAR5	0.41441	0.40541	0.40541	0.36937	0.36036	0.41441	0.36937
38	VAR6	0.44144	0.43243	0.41441	0.39640	0.36937	0.44144	0.36036
39	VAR7	0.36036	0.35135	0.35135	0.31532	0.30631	0.36036	0.33333
40	VAR8	0.36036	0.33333	0.33333	0.29730	0.30631	0.34234	0.33333
41	VAR9	0.33333	0.34234	0.34234	0.30631	0.29730	0.35135	0.32432
42	VAR10	0.36036	0.35135	0.35135	0.31532	0.32432	0.36036	0.35135
43	AGU1	0.42342	0.41441	0.37838	0.37838	0.38739	0.40541	0.37838
44	AGU2	0.42342	0.41441	0.39640	0.37838	0.36937	0.42342	0.39640
45	AGU3	0.40541	0.41441	0.37838	0.36036	0.38739	0.40541	0.36036
46	AGU4	0.45045	0.40541	0.36937	0.38739	0.37838	0.41441	0.36937
47	AGU5	0.44144	0.45045	0.41441	0.41441	0.40541	0.45946	0.39640
48	AGU6	0.42342	0.39640	0.37838	0.36036	0.36937	0.38739	0.36036
49	AGU7	0.42342	0.43243	0.39640	0.39640	0.38739	0.42342	0.37838
50	AGU8	0.40541	0.41441	0.39640	0.37838	0.38739	0.42342	0.37838
51	AGU9	0.42342	0.43243	0.39640	0.39640	0.38739	0.44144	0.37838
52	AGU10	0.44144	0.43243	0.37838	0.37838	0.38739	0.42342	0.36036
53	MER1	0.25225	0.29730	0.27928	0.27928	0.28829	0.28829	0.31532
54	MER2	0.28829	0.31532	0.35135	0.31532	0.30631	0.34234	0.33333
55	MER3	0.27027	0.36937	0.36937	0.35135	0.32432	0.37838	0.38739
56	MER4	0.28829	0.31532	0.31532	0.27928	0.28829	0.30631	0.29730
57	MER5	0.27027	0.31532	0.29730	0.29730	0.30631	0.30631	0.29730
58	MER6	0.25225	0.29730	0.29730	0.26126	0.27027	0.30631	0.29730
59	MER7	0.24324	0.36036	0.34234	0.32432	0.33333	0.33333	0.36036
60	MER8	0.25225	0.31532	0.31532	0.29730	0.32432	0.28829	0.33333
61	MER9	0.29730	0.32432	0.30631	0.30631	0.29730	0.31532	0.32432
62	MER10	0.25225	0.33333	0.33333	0.33333	0.28829	0.32432	0.33333
63	RIB1	0.33333	0.43243	0.41441	0.43243	0.40541	0.40541	0.43243
64	RIB2	0.36937	0.45045	0.43243	0.43243	0.40541	0.42342	0.43243
65	RIB3	0.31532	0.41441	0.41441	0.39640	0.38739	0.38739	0.41441
66	RIB4	0.36937	0.45045	0.43243	0.46847	0.44144	0.44144	0.48649
67	RIB5	0.35135	0.43243	0.43243	0.43243	0.38739	0.42342	0.45045
68	RIB6	0.29730	0.43243	0.41441	0.43243	0.42342	0.40541	0.45045
69	RIB7	0.36937	0.43243	0.39640	0.39640	0.36937	0.40541	0.41441
70	RIB8	0.32432	0.45946	0.40541	0.42342	0.41441	0.43243	0.42342
71	RIB9	0.36036	0.40541	0.38739	0.36937	0.36036	0.37838	0.38739
72	RIB10	0.34234	0.40541	0.38739	0.38739	0.36036	0.39640	0.38739
73	MON1	0.23423	0.27928	0.33333	0.29730	0.30631	0.30631	0.31532
74	MON2	0.22523	0.28829	0.32432	0.32432	0.31532	0.31532	0.32432
75	MON3	0.23423	0.31532	0.33333	0.33333	0.30631	0.34234	0.35135
76	MON4	0.23423	0.36937	0.36937	0.38739	0.36036	0.37838	0.36937
77	MON5	0.18018	0.31532	0.35135	0.35135	0.36036	0.32432	0.35135
78	MON6	0.23423	0.35135	0.40541	0.36937	0.37838	0.37838	0.38739
79	MON7	0.21622	0.38739	0.42342	0.38739	0.41441	0.41441	0.42342
80	MON8	0.24324	0.36036	0.37838	0.36036	0.40541	0.36937	0.39640
81	MON9	0.21622	0.35135	0.36937	0.36937	0.36036	0.36036	0.38739
82	MON10	0.22523	0.32432	0.36036	0.34234	0.35135	0.33333	0.34234
83	ITA1	0.12613	0.38739	0.38739	0.42342	0.37838	0.37838	0.38739
84	ITA2	0.16216	0.35135	0.35135	0.38739	0.37838	0.34234	0.40541
85	ITA3	0.18018	0.35135	0.33333	0.38739	0.36036	0.34234	0.36937
86	ITA4	0.15315	0.36036	0.37838	0.37838	0.36937	0.36937	0.39640
87	ITA5	0.19820	0.38739	0.40541	0.40541	0.37838	0.39640	0.42342
88	ITA6	0.16216	0.40541	0.40541	0.44144	0.41441	0.39640	0.44144
89	ITA7	0.16216	0.36937	0.38739	0.40541	0.34234	0.39640	0.38739
90	ITA8	0.14414	0.35135	0.35135	0.36937	0.39640	0.34234	0.35135
91	ITA9	0.11712	0.36036	0.37838	0.39640	0.38739	0.36937	0.39640
92	ITA10	-	0.31532	0.36937	0.36937	0.34234	0.32432	0.36937

93	ACA1	35	-	0.09009	0.09009	0.09910	0.06306	0.10811
94	ACA2	41	10	-	0.09009	0.11712	0.06306	0.12613
95	ACA3	41	10	10	-	0.08108	0.08108	0.07207
96	ACA4	38	11	13	9	-	0.12613	0.09910
97	ACA5	36	7	7	9	14	-	0.13514
98	ACA6	41	12	14	8	11	15	-
99	ACA7	41	8	8	6	9	7	12
100	ACA8	38	13	13	11	12	14	5
101	ACA9	36	13	13	13	10	14	13
102	ACA10	37	10	12	8	7	11	12

		99	100	101	102
1	<i>M.lateralis1</i>	0.43243	0.40541	0.38739	0.39640
2	<i>M.lateralis2</i>	0.43243	0.40541	0.38739	0.39640
3	PIR1	0.40541	0.36036	0.37838	0.36937
4	PIR2	0.41441	0.36937	0.36937	0.37838
5	PIR3	0.39640	0.33333	0.35135	0.36036
6	PIR4	0.39640	0.35135	0.36937	0.37838
7	PIR5	0.44144	0.39640	0.41441	0.40541
8	PIR6	0.44144	0.37838	0.37838	0.36937
9	PIR7	0.42342	0.36036	0.34234	0.36937
10	PIR8	0.41441	0.35135	0.36937	0.37838
11	PIR9	0.38739	0.32432	0.34234	0.35135
12	PIR10	0.36937	0.30631	0.32432	0.33333
13	CAE1	0.35135	0.34234	0.34234	0.35135
14	CAE2	0.36036	0.36937	0.36937	0.37838
15	CAE3	0.36937	0.36036	0.37838	0.35135
16	CAE4	0.36937	0.34234	0.37838	0.35135
17	CAE5	0.29730	0.28829	0.28829	0.29730
18	CAE6	0.38739	0.37838	0.39640	0.38739
19	CAE7	0.42342	0.39640	0.41441	0.42342
20	CAE8	0.34234	0.33333	0.33333	0.34234
21	CAE9	0.40541	0.39640	0.36036	0.38739
22	CAE10	0.38739	0.37838	0.37838	0.38739
23	PEQ1	0.41441	0.38739	0.38739	0.41441
24	PEQ2	0.38739	0.34234	0.36036	0.35135
25	PEQ3	0.32432	0.29730	0.29730	0.28829
26	PEQ4	0.41441	0.36937	0.35135	0.37838
27	PEQ5	0.39640	0.38739	0.40541	0.39640
28	PEQ6	0.40541	0.37838	0.41441	0.40541
29	PEQ7	0.39640	0.35135	0.36937	0.36036
30	PEQ8	0.38739	0.36036	0.37838	0.36937
31	PEQ9	0.45045	0.40541	0.44144	0.43243
32	PEQ10	0.41441	0.36937	0.38739	0.39640
33	VAR1	0.39640	0.36937	0.35135	0.34234
34	VAR2	0.36937	0.34234	0.32432	0.31532
35	VAR3	0.39640	0.35135	0.33333	0.34234
36	VAR4	0.41441	0.38739	0.35135	0.36036
37	VAR5	0.40541	0.37838	0.34234	0.36937
38	VAR6	0.41441	0.36937	0.35135	0.37838
39	VAR7	0.35135	0.34234	0.30631	0.31532
40	VAR8	0.33333	0.34234	0.28829	0.29730
41	VAR9	0.34234	0.33333	0.29730	0.30631
42	VAR10	0.35135	0.36036	0.30631	0.31532
43	AGU1	0.41441	0.35135	0.40541	0.37838
44	AGU2	0.39640	0.36937	0.40541	0.39640
45	AGU3	0.41441	0.35135	0.38739	0.37838
46	AGU4	0.38739	0.34234	0.39640	0.38739
47	AGU5	0.43243	0.38739	0.40541	0.41441
48	AGU6	0.39640	0.35135	0.38739	0.36036

49	AGU7	0.41441	0.36937	0.40541	0.37838
50	AGU8	0.41441	0.36937	0.38739	0.39640
51	AGU9	0.41441	0.36937	0.38739	0.39640
52	AGU10	0.41441	0.35135	0.38739	0.37838
53	MER1	0.33333	0.30631	0.27027	0.26126
54	MER2	0.35135	0.36036	0.28829	0.27928
55	MER3	0.35135	0.36036	0.32432	0.31532
56	MER4	0.29730	0.30631	0.27027	0.27928
57	MER5	0.33333	0.30631	0.28829	0.26126
58	MER6	0.29730	0.30631	0.25225	0.26126
59	MER7	0.36036	0.33333	0.31532	0.30631
60	MER8	0.31532	0.32432	0.30631	0.29730
61	MER9	0.34234	0.35135	0.29730	0.28829
62	MER10	0.33333	0.32432	0.28829	0.29730
63	RIB1	0.41441	0.42342	0.38739	0.39640
64	RIB2	0.45045	0.42342	0.40541	0.39640
65	RIB3	0.43243	0.42342	0.40541	0.39640
66	RIB4	0.45045	0.45946	0.42342	0.43243
67	RIB5	0.41441	0.45946	0.40541	0.43243
68	RIB6	0.45045	0.42342	0.42342	0.41441
69	RIB7	0.41441	0.38739	0.38739	0.37838
70	RIB8	0.44144	0.39640	0.41441	0.40541
71	RIB9	0.38739	0.37838	0.37838	0.36937
72	RIB10	0.36937	0.37838	0.36036	0.38739
73	MON1	0.31532	0.30631	0.32432	0.31532
74	MON2	0.34234	0.33333	0.33333	0.32432
75	MON3	0.33333	0.32432	0.32432	0.31532
76	MON4	0.38739	0.34234	0.34234	0.35135
77	MON5	0.35135	0.32432	0.32432	0.33333
78	MON6	0.38739	0.36036	0.37838	0.36937
79	MON7	0.40541	0.39640	0.43243	0.40541
80	MON8	0.37838	0.36937	0.38739	0.36036
81	MON9	0.36937	0.36036	0.34234	0.36937
82	MON10	0.36036	0.31532	0.33333	0.32432
83	ITA1	0.42342	0.36036	0.34234	0.36937
84	ITA2	0.38739	0.37838	0.36036	0.33333
85	ITA3	0.36937	0.34234	0.32432	0.31532
86	ITA4	0.39640	0.36937	0.35135	0.36036
87	ITA5	0.40541	0.41441	0.37838	0.38739
88	ITA6	0.42342	0.43243	0.36036	0.38739
89	ITA7	0.40541	0.37838	0.32432	0.36937
90	ITA8	0.36937	0.32432	0.34234	0.35135
91	ITA9	0.39640	0.40541	0.33333	0.36036
92	ITA10	0.36937	0.34234	0.32432	0.33333
93	ACA1	0.07207	0.11712	0.11712	0.09009
94	ACA2	0.07207	0.11712	0.11712	0.10811
95	ACA3	0.05405	0.09910	0.11712	0.07207
96	ACA4	0.08108	0.10811	0.09009	0.06306
97	ACA5	0.06306	0.12613	0.12613	0.09910
98	ACA6	0.10811	0.04505	0.11712	0.10811
99	ACA7	-	0.09910	0.11712	0.09009
100	ACA8	11	-	0.12613	0.09910
101	ACA9	13	14	-	0.08108
102	ACA10	10	11	9	-